Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

INVENTARIO

Organizacion CSA Ltda

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 0-1786

54. **TÍTULO** Inmunotoxinas Recombinantes que comprenden Un Dominio De Enlace De CD3, y un Mutante De Exotoxina A De Pseudomonas y usos Terapeuticos para las Mismas

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 39/04, 39/395 C07K 14/00

71. **SOLICITANTE** Novartis AG

DOMICILIO Basilea, Suiza

74. **APODERADO** Jimena Escobar Uribe

22. **BOGOTÁ, D. C.,** Enero 14, 2000.

(FORMA P-10)

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** 0-1786

54. **TITULO** *INMUNOTOXINAS RECOMBINANTES QUE COMPRENDEN UN DOMINIO DE ENLACE DE CD3, Y UN MUTANTE DE EXOTOXINA A DE PSEUDOMONAS Y USOS TERAPEUTICOS PARA LAS MISMAS.*

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL** A 61 K 39/04, 39/395 // C07K 19/00

71. **SOLICITANTE** *NOVARTIS AG*

DOMICILIO *BASILEA, SUIZA*

74. **APODERADO** *JIMENA ESCOBAR URIBE*

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.** *ENERO 14, 2000*

202094

(FORMA P 10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

00 1786

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00001786 00000000 Folios: 153
Fecha (AMD): 2000-01-14 15:59:55
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 001 SOLICITUD
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

1

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social: NOVARTIS AG

No. de Identificación:

Representante Legal (Persona Jurídica):

País de Domicilio: SUIZA

Departamento o Estado:

Dirección:

Ciudad: BASILEA Teléfono:

(74) DATOS DEL APODERADO

Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE

Dirección y Domicilio: CRA. 11A No. 94-76, OFICINA 305

Ciudad: SANTAFÉ DE BOGOTÁ Teléfono: 6 162051/61

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es): 1. MARY ELLEN DIGAN; 2. PHILIP LAKE; 3. RICHARD MICHAEL WRIGHT.

Identificación:

Dirección: 1. MORRISTOWN, NEW JERSEY, E.U.A.; 2. MORRIS PLAINS, NEW JERSEY, E.U.A.; 3. ANNANDALE, NEW JERSEY, E.U.A.

Ciudad:

Teléfono:

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCIÓN

(54) Título de la Invención: INMUNOTOXINAS RECOMBINANTES QUE COMPRENDEN UN DOMINIO DE ENLACE DE CD3, Y UN MUTANTE DE EXOTOXINA A DE PSEUDOMONAS Y USOS TERAPEUTICOS PARA LAS MISMAS.

PRIORIDAD REIVINDICADA: SÍ [X] NO *TIPO DE PRIORIDAD:* ANDINA [ ] UNIONISTA [X]

(33) País ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA Fecha ENERO 15, 1999 (31) No. Solicitud 09/232445

Para publicar a los [X] 6 meses [ ] 12 meses [ ] 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud.

(51) CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A 61K 39/104, A61K 39/395, C07K 19/00

2288/P

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

Proveer un polipéptido de inmutoxina recombinante que comprende un dominio de enlace de CD3, y un mutante de exotoxina de Pseudomonas, y en particular, que comprenden un Fv de una sola cadena (sc) como la fracción de enlace de CD3. Una especie preferida de la invención comprende scFv (UCHT-1) – PE38. También se dan a conocer métodos para la preparación de estas inmunotoxinas; inmunotoxinas funcionalmente equivalentes que son intermediarios en la preparación de las inmunotoxinas de la invención, así como intermediarios de polinucleótidos y oligonucleótidos; métodos para la prevención y/o el tratamiento de rechazo de trasplante de inducción de tolerancia, así como el tratamiento de desórdenes autoinmunes y otros desórdenes inmunes, utilizando las inmunotoxinas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas; y composiciones farmacéuticas que comprenden las inmunotoxinas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica No. 17.398	X
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC No. 17.398	X
Recibo de la tasa respectiva No. 99 – 70, 834 y No. 00 - 2, 314	X
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	
Traducción oficial	
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud:	
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	
Capitulo descriptivo	X
Dibujos planos necesarios	
Capítulo reivindicatorio	X
Tarjeta archivo propiedad según formato	X
Tarjeta archivo temático según formato	X
Extracto para publicación según formato	X
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	
Otros documentos	

SOLICITO LA CONCESIÓN DE LA PATENTE DE INVENCIÓN Y DECLARO QUE LA INVENCIÓN ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA
NOMBRE **JIMENA ESCOBAR URIBE** **C.C. 39.779.452 Usaquén.** **T.P. No. 68.228**

2288

2

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00001786 00000000
Fecha (AMD): 2000-01-14 15:59:55
Tracite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 001 SOLICITUD
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 153

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 99 - 70,834
FECHA : DICIEMBRE 27 DE 1999

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00024-9	348852	23/12/1999	4,043,500.00

***** 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	553,000.00
		TOTAL : $	553,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

2288

3

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00001786 00000000
Fecha (AMD): 2000-01-14 15:59:55 Folios: 153
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 001 SOLICITUD
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 00 - 2,314
FECHA : ENERO 11 DE 2000

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00001786

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00024-9	344835	11/01/2000	894,200.00

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

CANT.	CENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99	OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	55,000.00
			TOTAL : $	55,000.00

SON: CINCUENTA Y CINCO MIL PESOS

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
PRODUCCION

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

INMUNOTOXINAS ANTI-CD3 Y USOS TERAPEUTICOS PARA LAS MISMAS

La presente invención se refiere a inmunotoxinas recombinantes que comprenden un dominio de enlace de CD3, y un mutante de exotoxina A de *Pseudomonas*.

Sobre la superficie de cada célula T madura hay moléculas receptoras de células T (TCR), consistentes en un heterodímero de cadenas de polipéptido α y ß (o alternativamente, cadenas ϒ y δ). Los heterodímeros α:ß receptores de células T, de los cuales hay unos 30,000 en cada célula, son capaces de engarzarse con el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) sobre una célula que presente antígeno (APC), y de esta manera cuentan para el reconocimiento del antígeno por todas las clases funcionales de células T. El heterodímero α:ß mismo no parece estar involucrado en la transducción de señal enseguida del engarce del receptor de células T mediante los complejos de antígeno MHC-péptido específicos. En su lugar, esa función es proporcionada por un complejo de proteínas que están establemente asociadas con los heterodímeros αß ó γδ receptores de células T sobre la superficie de todas las células T periféricas y los timocitos maduros, es decir, el complejo CD3. El complejo CD3 humano comprende seis polipéptidos normalmente con cuatro cadenas diferentes: γ, δ, ε, y ζ. Tres dímeros diferentes constituyen el complejo CD3 (γε, δε, y ζζ), [Kishimoto y colaboradores

(Editores), Leukocyte Typing VI, Garland Publishing, Inc., (1998) 44]. Las proteínas CD3 son absolutamente esenciales para la expresión en la superficie celular de las cadenas receptoras de células T. Los mutantes que carecen ya sea de las cadenas receptoras de células T o de cualquiera de las cadenas γ, δ, ó ε del complejo CD3, fracasan para expresar cualquiera de las cadenas del receptor de células T en la superficie celular [Janeway y Travers, Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, Capítulo 4 ("Antigen Recognition by T Lymphocytes"), Current Biology Ltd., Londres y Garland Publishing Inc., Nueva York (1996)].

La activación de células T específica del antígeno y la expansión clonal se presentan cuando la célula que presenta el antígeno suministra dos señales a la superficie de los linfocitos T en reposo. La primera señal, que confiere especificidad a la respuesta inmune, es mediada por medio del receptor de células T en seguida del reconocimiento del péptido antigénico extraño presentado en el contexto del complejo de histocompatibilidad mayor. Una señalización óptima a través del receptor de células T requiere de un agrupamiento del receptor de células T con los co-receptores CD4 ó CD8. A su vez, esto da como resultado una mayor asociación de las cinasas de tirosina citosólicas con el receptor de células T y las colas citoplásmicas CD3, así como con CD45. La fosforilación del dominio citoplásmico de CD3ε y ζ da como resultado el enlace de

las cinasas de tirosina, iniciando una serie de eventos intracelulares que dan como resultado la proliferación y diferenciación de la célula T. La segunda señal, denominada "coestímulo", que no es específica del antígeno ni está restringida a la célula que presenta el antígeno, es proporcionada por una o más moléculas distintas de superficie celular expresadas por las células que presentan el antígeno [Janeway y Travers, *supra* en 4-28]. El suministro de una señal específica del antígeno con una señal coestimulante a una célula T, conduce a la activación de la célula T, que puede incluir tanto proliferación de las células T como secreción de citocina. La combinación de antígeno y co-estimulante induce a las células T naturales a expresar IL-2 y su receptor. La IL-2 induce la expansión clonal de la célula T natural, y la diferenciación de su progenie en células T efectoras armadas que son capaces de sintetizar todas las proteínas requeridas para sus funciones especializadas como células T auxiliares, inflamatorias, y citotóxicas, ver, por ejemplo, Janeway y Travers, *supra*, en §§7-8, 7-9.

Los mecanismos inmunes adaptables descritos anteriormente, constituyen un impedimento mayor para una trasplante de órgano con éxito. Cuando se trasplantan tejidos que contienen células nucleadas desde un donador hasta un receptor del injerto, las respuestas de las células T en el receptor, a las moléculas de los complejos de

histocompatibilidad mayor normalmente altamente polimórficas del injerto, casi siempre desencadenan una respuesta inmediata mediada por células T contra el órgano injertado. El uso de inmunosupresores potentes, tales como ciclosporina A y FK-506 para inhibir la activación de células T, ha incrementado dramáticamente los índices de sobrevivencia de injertos, pero con ciertos inconvenientes, incluyendo una dependencia de toda la vida en el fármaco por el receptor del injerto.

El desarrollo de medios mejorados de inmunosupresión en pacientes que reciben trasplante de órganos, o que sufren de enfermedad inmune mediada por células T, ha sido un objetivo constante en el campo de los trasplantes. Un objetivo particular de los trabajadores en la técnica, es el desarrollo de un agente terapéutico capaz de inducir tolerancia inmunológica específica del donador en un paciente, y de esta manera liberar al paciente de la dependencia de otra manera continua en los inmunosupresores.

El término "tolerancia inmunológica" se refiere a un estado de falta de responsividad por parte del sistema inmune de un paciente sujeto a estímulo con el antígeno para el que se ha inducido tolerancia. En el campo de los trasplantes, en particular, se refiere a la inhibición de la capacidad del receptor del injerto para presentar una respuesta inmune, que de otra manera se presentaría en respuesta a la introducción de un antígeno de complejo de histocompatibilidad mayor no propio

del injerto en el receptor. La inducción de la tolerancia inmunológica puede involucrar mecanismos humorales, celulares, o tanto humorales como celulares.

La tolerancia inmunológica sistémica específica del donador se ha demostrado en modelos animales, así como en seres humanos, a través de quimerismo como un resultado del acondicionamiento del paciente a través de la irradiación del cuerpo total o irradiación linfoide total, antes del trasplante de médula ósea con células donadoras [Nikolic y Sykes, Immunol. Res. 16:217-228 (1997)]. Sin embargo, queda una necesidad crítica de un régimen de acondicionamiento para el trasplante alogenéico de médula ósea que dé como resultado un quimerismo alogenéico mixto de múltiples linajes, estable, y tolerancia específica del donador a largo plazo, en ausencia de radiación. Anteriormente se han excluido las anormalidades hematológicas, incluyendo talasemia y enfermedad de células débiles, estados autoinmunes, y varios tipos de estados de deficiencia enzimática, de las estrategias de trasplante de médula ósea, debido a la morbidez asociada con el acondicionamiento para lograr una reconstitución de médula ósea completamente halogenéica. Los planteamientos del acondicionamiento que no implican radiación, pueden extender de una manera significativa la aplicación del trasplante de médula ósea para las enfermedades no malignas.

Se han propuesto las inmunotoxinas que comprenden un

anticuerpo enlazado con una toxina, para la profilaxis y/o el tratamiento de rechazo de trasplante de órgano e inducción de tolerancia inmunológica. Por ejemplo, se ha utilizado una inmunotoxina de difteria químicamente conjugada contra CD3ε de Rhesus, es decir, FN18-DT390, en modelos de primate de tolerante de aloinjerto, y también en modelos de xenoinjerto concordantes de islotes de primates [Knechtle y colaboradores, Transplantation 63:1 (1997); Neville y colaboradores, J. Immunother. 19:85 (1996); Thomas y colaboradores, Transplantation 64:124 (1997); Contreras y colaboradores, Transplantation 65:1159-1169 (1998)]. Adicionalmente, se ha utilizado una inmunotoxina de *Pseudomonas* químicamente acoplada, LMB-1 B3(Lys)-PE38, en ensayos clínicos contra tumores sólidos avanzados (Pai y Pastan, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 234:83-96 (1998)]. Sin embargo, la heterogeneidad del producto es una dificultad práctica significativa asociada con las inmunotoxinas químicamente conjugadas.

Se ha propuesto una inmunotoxina recombinante de una sola cadena que comprende la región variable de un anticuerpo anti-CD3, UCHT-1, y una toxina de difteria, como un agente terapéutico (Publicaciones Internacionales Números WO 96/32137 y WO 98/39363). Sin embargo, la vacunación temprana de la población en general contra la difteria presenta preocupaciones acerca de los anticuerpos previamente existentes para la toxina en muchos pacientes. De una manera alternativa, también se

propone una inmunotoxina recombinante que comprende anti-Tac enlazado con PE38, como una profilaxis y un tratamiento contra el trasplante de órganos y contra enfermedades autoinmunes [Mavroudis y colaboradores, Bone Marrow Transplant. 17:793 (1996)].

Ha sido un objetivo lograr una inmunotoxina recombinante que tenga un efecto tóxico dirigido en altos niveles contra las células T, que de esta manera proporcione mejoras en la profilaxis o en el tratamiento de rechazo de trasplante y en la inducción de tolerancia inmunológica, así como en el tratamiento o en la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), enfermedad autoinmune, y otras enfermedades o condiciones mediadas por células T.

También ha sido un objetivo proporcionar una inmunotoxina contra la cual el receptor normalmente esté libre de los anticuerpos previamente existentes.

Ahora hemos descubierto que las fusiones recombinantes de un dominio de enlace de CD3 y un mutante de exotoxina de *Pseudomonas*, proporcionan una inmunotoxina que tiene un potente efecto contra las células T. Las inmunotoxinas de la invención proporcionan mejoras en el tratamiento clínico o en la prevención de rechazo de trasplante, enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), enfermedad autoinmune mediada por células T, leucemias de células T, o linfomas que llevan el epítopo CD3, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), y

otras enfermedades y condiciones mediadas por células T.

La presente invención se refiere a inmunotoxinas recombinantes aisladas que comprenden un dominio de enlace de CD3 y un componente de exotoxina A de *Pseudomonas*, y sales farmacéuticamente aceptables de las mismas; a métodos in vivo y ex vivo para el tratamiento y profilaxis de rechazo de trasplante de órgano y enfermedad del injerto contra el huésped, y para la inducción de tolerancia inmunológica, así como para el tratamiento o la profilaxis de enfermedades autoinmunes, SIDA, y otros desórdenes inmunológicos mediados por células T, y leucemias o linfomas de células T, utilizando las inmunotoxinas o las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas; y a composiciones farmacéuticas que comprenden las inmunotoxinas novedosas o sus sales farmacéuticamente aceptables.

La invención también se refiere a polinucleótidos y polipéptidos equivalentes fisiológicamente funcionales que son intermediarios en la preparación de las presentes inmunotoxinas recombinantes; a vectores de expresión recombinante que comprenden estos polinucleótidos, sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos, y a procesos para sintetizar las inmunotoxinas utilizando estos sistemas de expresión; y a métodos para la purificación de las inmunotoxinas de la invención.

En particular, la invención se refiere a una novedosa

inmunotoxina recombinante, scFv(UCHT-1)-PE38, que es un fragmento Fv de una sola cadena ("sc") del anticuerpo monoclonal de murino anti-CD3 humano, UCHT-1, fusionado con un fragmento truncado de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, es decir, PE38. Por ejemplo, hemos encontrado que este scFv(UCHT-1)-PE38 es altamente efectivo en la aniquilación de células T in vitro; y además hemos encontrado que la inmunotoxina es capaz de ablacionar las células T doblemente positivas de CD3 murino/CD3 humano en altos niveles de una respuesta dependiente de la dosis in vivo en ratones transgénicos para CD3ε humano.

1. Dominio de Enlace de CD3

El término "dominio de enlace de CD3" se refiere a una secuencia de aminoácidos capaz de enlazarse o de asociarse de otra manera con el antígeno CD3 de mamífero, y más preferiblemente de primate, y todavía más preferiblemente de humano, sobre las células T o los linfocitos.

El dominio de enlace de CD3 de las inmunotoxinas de la invención es de preferencia un anticuerpo policlonal o monoclonal para CD3, y más preferiblemente es un anticuerpo monoclonal anti-CD3. De una manera todavía más preferible, el anticuerpo anti-CD3 es un anticuerpo monoclonal que es capaz de enlazarse con un epítopo sobre la cadena e del CD3 humano, o alternativamente un epítopo formado por las cadenas ε y γ.

El término "anticuerpo" como se utiliza en la presente, incluye las inmunoglobulinas intactas, así como diferentes formas de anticuerpos modificados o alterados, incluyendo fragmentos de anticuerpos, tales como un fragmento Fv, un fragmento Fv enlazado por un enlace de disulfuro, o un fragmento Fab ó $(Fab)'_2$, un anticuerpo de una sola cadena, y otros fragmentos que retengan la función de enlace de antígeno y la especificidad del anticuerpo parental. El anticuerpo puede ser de origen animal (especialmente ratón o rata), o humano, o puede ser quimérico o humanizado. Los métodos para producir anticuerpos capaces de enlazarse específicamente con el antígeno CD3, y más particularmente con el antígeno CD3 humano, se pueden producir mediante hibridomas preparados utilizando los procedimientos bien conocidos derivados del trabajo de Kohler y Milstein [Nature 256:495-97 (1975)]. Como es bien conocido en la materia, una cadena "pesada" o "ligera" de anticuerpo, tiene una región N-terminal variable (V), y una región C-terminal constante (C). La región variable es la parte de la molécula que se enlaza con el antígeno conocido del anticuerpo, mientras que la región constante determina la función efectora del anticuerpo. La inmunoglobulina de longitud completa o las cadenas pesadas de anticuerpo comprenden una región variable de aproximadamente 116 aminoácidos, y una región constante de aproximadamente 350 aminoácidos. La inmunoglobulina de longitud completa o las cadenas ligeras de

anticuerpo comprenden una región N-terminal variable de aproximadamente 110 aminoácidos, y una región constante de aproximadamente 110 aminoácidos en el término COOH. La región variable de cadena pesada es referida como V_H, y la región variable de cadena ligera es referida como V_L. Normalmente, la V_L incluirá la porción de la cadena ligera codificada por los segmentos genéticos de la V_L y J_I (es decir, la región de unión) [Sakans y colaboradores, Nature 280:288-294 (1979)], y la "V_H" incluirá la porción de la cadena pesada codificada por los segmentos genéticos V_H, D_H (es decir, región de diversidad), y J_H [Early y colaboradores, Cell 19:981-92 (1980)]. Los fragmentos V_H y V_L son referidos juntos como "Fv". La región Fv de un anticuerpo intacto es un heterodímero de (es decir, comprende, en cadenas separadas), los dominios V_H y V_L.

El término "$F(ab')_2$" utilizado anteriormente en la presente, se refiere a un fragmento divalente de un anticuerpo que incluye las regiones de articulación y las regiones variables y las primeras regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, que se pueden producir mediante la digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo nativa, o mediante elementos recombinantes. El término "Fab" se refiere a un fragmento monovalente de un anticuerpo, que incluye la región variable y las primeras regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, que se pueden generar mediante la reducción de los puentes de disulfuro del fragmento $F(ab')_2$, o mediante

elementos recombinantes.

Como es bien conocido en este campo, una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina comprende tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) flanqueadas por cuatro "regiones de estructura" (FR) relativamente conservadas. Las regiones de estructura combinadas de las cadenas ligera y pesada constitutivas sirven para colocar y alinear las regiones determinantes de complementariedad. Las regiones determinantes de complementariedad son primordialmente responsables del enlace con un epítopo de un antígeno, y son típicamente referidas como CDR1, CDR2, y CDR3, numeradas en secuencia empezando a partir del término N de la cadena de la región variable. Las regiones de estructuras se numeran de una manera similar. Se han descrito numerosas regiones de estructura y regiones determinantes de complementariedad [Kabat y Wu, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Oficina de Impresión del Gobierno de los Estados Unidos, NIH Publicación Número 91-3242 (1991)]. Los segmentos de polipéptido de la región determinante de complementariedad y de la región de estructura se designan empíricamente basándose en el análisis de secuencia de la región Fv de los anticuerpos previamente existentes, o del ADN que los codifica. A partir del alineamiento de las secuencias de anticuerpos de interés, con aquellas publicadas en Kabat y Wu y en cualquier otra parte,

las regiones de marco y las regiones determinantes de complementariedad se pueden determinar para el anticuerpo u otra región de enlace de CD3 de interés.

"Quimérico" significa en general un anticuerpo genéticamente diseñado que comprende secuencias derivadas a partir de más de un anticuerpo natural. Un ejemplo de un anticuerpo quimérico es uno en donde el marco y las regiones determinantes de complementariedad son de diferentes fuentes, como cuando se enlaza un dominio variable no humano con un dominio constante humano. Como un subconjunto de lo mismo, se entiende en general que un anticuerpo "humanizado" comprende un anticuerpo en donde se integran las regiones determinantes de complementariedad no humanas en las regiones de estructura, cuando menos una porción de las cuales es humana.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo de una sola cadena" (o el término "inmunotoxina de una sola cadena"), se refiere a una molécula en donde el dominio o los dominios de enlace de CD3 están sobre una sola cadena del polipéptido. Los anticuerpos de una sola cadena normalmente se preparan mediante la determinación y el aislamiento del dominio de enlace de cada una de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de enlace, y suministrando una fracción de enlace que permita la conservación de la función de enlace. Esto forma, en esencia, un anticuerpo radicalmente abreviado, que tiene, sobre una sola cadena del polipéptido, solamente aquella

parte del dominio variable necesaria para enlazarse con el antígeno. Los métodos para la preparación de anticuerpos de una sola cadena se describen en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US-A-4,946,778, incorporada como referencia.

Una inmunotoxina de una sola cadena de acuerdo con la invención comprende este fragmento de anticuerpo de una sola cadena. El componente de toxina de preferencia se fusiona con los dominios de enlace de CD3, opcionalmente por medio de un péptido enlazador, pero también puede existir como una cadena de polipéptido separada enlazada por medio de uno o más enlaces de disulfuro con la cadena que contiene el dominio de enlace de CD3.

Una inmunotoxina de la invención puede ser "monovalente", con lo que queremos decir que contiene un dominio de enlace de CD3 (por ejemplo, las regiones variables VH y VL combinadas de un anticuerpo) sobre la cadena.

Una inmunotoxina de la invención también puede ser "divalente", con lo que queremos decir que contiene dos dominios de enlace de CD3. Los dos dominios de enlace de antígeno se pueden localizar sobre una sola cadena, o alternativamente, sobre dos o más cadenas enlazadas mediante enlaces de disulfuro o de otra manera en estrecha asociación debido a fuerzas de atracción (por ejemplo, enlaces de hidrógeno). Cuando dos dominios de enlace de CD3 están sobre

una sola cadena, pueden estar presentes en hilera (es decir, siguiéndose consecutivamente en serie en la cadena), o pueden estar separados por enlazadores, un mutante PE, u otros dominios funcionales.

Los anticuerpos de una sola cadena (o las inmunotoxinas de una sola cadena) pueden multimerizarse después de la expresión, dependiendo del sistema de expresión, mediante la formación de enlaces de disulfuro inter-cadenas con otras moléculas de una sola cadena (o de doble cadena), o por medio de la afinidad intrínseca de los dominios para su asociado. Las cadenas pueden ser homodímeros o heterodímeros.

La fracción de enlace de CD3 de las inmunotoxinas de la invención es de preferencia un anticuerpo "recombinante". De la misma manera, las inmunotoxinas de la invención son inmunotoxinas "recombinantes". Mediante la utilización del término "recombinante", se entiende que el anticuerpo (o la inmunotoxina) se sintetiza en una célula a partir de segmentos de nucleótidos (por ejemplo, ADN) producidos mediante ingeniería genética. El término "aislado" indica que un polipéptido se ha removido de su medio ambiente nativo. Un polipéptido producido y/o contenido dentro de una célula hospedera recombinante, se considera aislado para los propósitos de la presente invención. También se pretende como un "polipéptido aislado" los polipéptidos que se han purificado, parcialmente o sustancialmente, a partir de una

célula hospedera recombinante.

De preferencia, la fracción de enlace de CD3 de las inmunotoxinas de la invención es un anticuerpo de una sola cadena ("sc"). La inmunotoxina es de preferencia monovalente.

De una manera más preferible, la fracción de enlace de CD3 de la invención comprende una región Fv de una sola cadena (o un fragmento de enlace de CD3 de la misma) de un anticuerpo, es decir, en donde se fusiona la región V_H (o su porción de enlace de CD3) con la región V_L (o su porción de enlace de CD3), opcionalmente por medio de un péptido enlazador.

La región V_L de preferencia se enlaza por medio de su término carboxilo con el término amino de la región V_H; de una manera alternativa, la región V_H se puede enlazar alternativamente mediante su término carboxilo con el término amino de la región V_L.

Cualquier enlazador de péptido de las regiones V_L y V_H de preferencia permite el pliegue independiente y la actividad del dominio de enlace de CD3; es libre de una propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que pudiera interferir con el dominio de enlace de CD3, u ocasionar una reacción inmunológica en el paciente, y tiene una característica hidrofóbica o cargada mínima que pudiera interactuar con el dominio de enlace de CD3.

El conector de péptido de preferencia es de 1 a 500 aminoácidos; más preferiblemente de 1 a 250; y todavía más

20

preferiblemente de no más de 1 a 100 (por ejemplo, de aproximadamente 1 a 25 ó 10 a 20) aminoácidos.

Para cada una de las preferencias anteriores, el enlazador es de preferencia lineal.

En general, se puede esperar que los enlazadores que comprendan Gly, Ala, y Ser, satisfagan los criterios para este péptido. Por ejemplo, el enlazador en scFv(UCHT-1)PE38, que enlaza el término carboxilo del dominio V_L con el término amino del dominio V_H, es $[GGGS]_4$ (SEQ ID NO:5).

Los ejemplos de los anti-CD3 específicos, enteros, o cuyos fragmentos son adecuados para emplearse como un dominio de enlace de CD3 de la invención son:

(1) UCHT-1 [Beverley y Callard, Eur. J. Immunol. 11:329 (1981); Burns y colaboradores, J. Immunol. 129:1451 (1982)], la secuencia scFv que se incluye en la SEQ ID NO:2. UCHT-1 es un anticuerpo anti-CD3 monoclonal de ratón anti-humano que tiene un isotipo κ, IgG1. El anticuerpo reacciona con las células T del timo, de la médula ósea, del tejido linfoide periférico, y de la sangre. El anticuerpo intacto está comercialmente disponible en Biomeda (Catálogo Número K009, V1035) o Coulter Corp.. Las regiones variables comprenden los residuos 3 a 112 (cadena ligera), y 128 a 249 (cadena pesada) de la SEQ ID NO:2 de la presente. UCHT-1 es no activador como un fragmento Fv, y se ha utilizado como un asociado de fusión con los inmunoconjugados biespecíficos anti-HER2 en la

dirección de las células T hacia las células tumorales de pecho y ovario humanas [Shalaby y colaboradores, J. Exp. Med. 175:217 (1992)].

(2) SP34 (primeramente aislado por C. Terhorst, Beth Israel Deaconess Hospital), reacciona con CD3 tanto de primate como humano. SP34 difiere de UCHT-1 y de BC-3 (descrito más adelante), en que el SP34 reconoce un epítopo presente exclusivamente sobre la cadena ε de CD3 (ver Salmeron y colaboradores (1991) *J. Immunol.* 147:3047), mientras que UCHT-1 y BC-3 reconocen un epítopo contribuido por ambas cadenas ε y γ. El anticuerpo intacto está comercialmente disponible en PharMingen.

(3) BC-3 (Fred Hutchinson Cancer Research Institute) (utilizado en los ensayos de Fase I/II de GvHD [Anasetti y colaboradores, Transplantation 54:844 (1992)].

Se considera que otros anticuerpos monoclonales que tienen afinidad de enlace específica para el antígeno CD3, y que tienen cuando menos algunas secuencias de origen humano, están dentro del alcance de los homólogos de los anticuerpos anteriormente mencionados. Estos anticuerpos incluyen: (1) un anticuerpo monoclonal que tiene regiones determinantes de complementariedad idénticas con, por ejemplo, UCHT-1 (ó SP34 ó BC3), y que tiene cuando menos un segmento de secuencia de cuando menos cinco aminoácidos de origen humano; y (2) un anticuerpo monoclonal que compite con, por ejemplo, UCHT-1, por

22

el enlace al antígeno CD3 humano cuando menos aproximadamente el 80 por ciento, y más preferiblemente cuando menos el 90 por ciento tan efectivamente sobre una base molar que el UCHT-1, y que tiene cuando menos un segmento de secuencia de cuando menos cinco aminoácidos de origen humano. "Afinidad de enlace específico" significa la afinidad de enlace determinada por las interacciones no covalentes, tales como los enlaces hidrofóbicos, los enlaces de sal, y los enlaces de hidrógeno sobre la superficie de las moléculas de enlace. A menos que se informe de otra manera, "afinidad de enlace específico" implica una constante de asociación de cuando menos aproximadamente 10^6 litros/mol para una reacción bimolecular.

Los anticuerpos de esta invención que tienen regiones determinantes de complementariedad sustancialmente homólogas con aquellas de, por ejemplo, UCHT-1, también están dentro del alcance de esta invención, y se pueden generar mediante mutagénesis in vitro. Entre las mutaciones que se pueden introducir en las regiones constantes o variables que conservan sustancialmente la afinidad y especificidad de estos homólogos, están las mutaciones que dan como resultado sustituciones de aminoácidos conservadoras, tales como se conocen bien en la técnica. Con respecto a UCHT-1, estas formas mutantes de anticuerpos de preferencia tienen regiones variables que son cuando menos el 80 por ciento idénticas, y más preferiblemente cuando menos el 90 por ciento idénticas, a la región variable

de UCHT-1. De una manera todavía más preferible, cada una de las regiones determinantes de complementariedad de estas formas mutantes de anticuerpos, es cuando menos el 80 por ciento, y más preferiblemente cuando menos el 90 por ciento, o cuando menos el 95 por ciento idéntica a la región determinante de complementariedad correspondiente de UCHT-1.

Como un asunto práctico, el hecho de que cualquier secuencia de polipéptido particular sea cuando menos el 80 por ciento, el 90 por ciento, o cuando menos el 95 por ciento, "idéntica a" otro polipéptido, se puede determinar convencionalmente utilizando programas de computación conocidos, tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). Cuando se utiliza Bestfit o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 por ciento idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se establecen, por supuesto, de tal manera que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia, y que se permitan huecos en la homología de hasta el 5 por ciento del número total de residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia.

La fracción de enlace de CD3 de la invención, en una

modalidad preferida, reconoce un epítopo de CD3 humano formado por ambas cadenas γ y ε, y de preferencia es UCHT-1, y más preferiblemente es la región Fv (o su fragmento de enlace de CD3) de UCHT-1. De una manera todavía más preferible, la fracción de enlace de CD3 es un fragmento de una sola cadena de UCHT-1, y más preferiblemente es una región Fv de una sola cadena (o su fragmento de enlace de CD3) de UCHT-1.

Se ha encontrado que la región Fv de UCHT-1, cuando se reconstituye como una sola cadena, y se fusiona con un fragmento que tenga suprimido el dominio de enlace celular de la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, demuestra altos niveles de potencia en la aniquilación de células T en ensayos convencionales in vitro, e in vivo en ratones transgénicos heterocigóticos para CD3ε humano.

2. **Componente de Toxina de *Pseudomonas***

La exotoxina-A de *Pseudomonas* (posteriormente en la presente "PE"), es una proteína monomérica extremadamente activa de 613 aminoácidos (peso molecular de 66 Kd), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteína en las células eucarióticas a través de la inactivación del factor de elongación 2 (EF2), un factor de traducción eucariótica esencial, mediante la catalización de su Ribosilación de ADP (es decir, catalización de la transferencia de la fracción de ribosilo de ADP del NAD oxidado sobre el EF2), [Kreitman y Pastan Blood 83:426 (1994)]. El polipéptido

25

maduro tiene la secuencia de aminoácidos estipulada en la SEQ ID NO:3 de la presente, que normalmente está precedida por una secuencia de señal de 25 residuos, como se estipula en la SEQ ID NO:4.

Tres dominios estructuralmente distintos en la PE nativa actúan en concierto para promover la citotoxicidad (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 4,892,827, US 5,696,237, y US 5,863,745, todas incorporadas como referencia). El dominio Ia, en el término amino (y generalmente los residuos asignados 1 a aproximadamente 252 de la SEQ ID NO:3), media la dirección a la célula y su enlace. El dominio II (en los residuos 253-364 de la SEQ ID NO:3) es responsable de la translocación a través de la membrana celular hacia dentro del citosol; y el Dominio III (residuos 405 a 613 de la SEQ ID NO:3) media la Ribosilación de ADP del factor de elongación 2, inactivando de esta manera la proteína, y ocasionando la muerte celular. El dominio III contiene una secuencia carboxi-terminal (REDLK) (SEQ ID NO:6) que dirige la toxina endocitosada y procesada hacia adentro del retículo endoplásmico. Mientras que el dominio Ib (residuos 365-404 de la SEQ ID NO:3) parece actuar en concierto con el dominio III, la supresión de los residuos 365-380 de este dominio no da como resultado ninguna pérdida de actividad.

El "mutante de PE" o alternativamente el "componente de PE" de las inmunotoxinas de la invención, es una forma mutante

de la PE nativa, que tiene funciones de translocación y catalítica (es decir, Ribosilación de ADP), pero que tiene una capacidad de enlace a las células sustancialmente disminuida o suprimida. La alteración o supresión de todo o sustancialmente todo el dominio de enlace celular Ia, se ha encontrado que reduce sustancialmente la capacidad de enlace celular, y por lo tanto, la toxicidad no específica de la molécula PE nativa. Por ejemplo, la supresión del dominio Ia produce una proteína de 40 kDa, PE40, que en sí misma no es citotóxica, a pesar de retener las funciones de translocación y ribosilación de ADP de los dominios II y III, respectivamente (Kondon y colaboradores, J. Biol. Chem, 263:9470-9475 (1988)].

PE38 es un fragmento de 38 kDa de PE, que carece también esencialmente del Dominio Ia de la proteína PE madura (por ejemplo, que carece de los aminoácidos 1-250 de la SEQ ID NO:3), y que también carece de los residuos de aminoácidos 365 a 380 de la SEQ ID NO:3, y por lo tanto, que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 251 a 364 unidos con 381 a 613 de la SEQ ID NO:3 (ver los residuos 255-601 de la SEQ ID NO:2). Ver, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,608,039, columna 10, II. 1-20 (PE se indica para referirse a una toxina truncada compuesta de los aminoácidos 253-364 y 381-613 de la PE nativa). De una manera conveniente, PE38 carece de los residuos de cisteína en las posiciones 372 y 379 de la proteína nativa, que de otra manera

pueden formar potencialmente enlaces de disulfuro con otras cisteínas durante el proceso de renaturalización, y pueden conducir a la formación de toxinas quiméricas inactivas.

Un componente de toxina PE de los polipéptidos de la invención también puede comprender un polipéptido que es cuando menos 90 por ciento idéntico a, y más preferiblemente cuando menos 95 por ciento idéntico a, y todavía más preferiblemente cuando menos 99 por ciento idéntico a, la secuencia definida por los residuos 255-601 de la SEQ ID NO:2, en donde el término "idéntico a" tiene el significado indicado anteriormente.

PE38KDEL tiene la secuencia de aminoácidos de PE38, descrita anteriormente, con la excepción de que el término carboxilo de la toxina está cambiado desde la secuencia original REDLK (SEQ ID NO:6). Hasta KDEL (SEQ ID NO:8).

Se pueden hacer otras supresiones o cambios en PE o en adición de un enlazador, tal como una región constante IgG que conecte un anticuerpo con PE, con el objeto de incrementar la citotoxicidad de la proteína de fusión hacia las células blanco, o para disminuir la citotoxicidad no específica hacia las células que carezcan del antígeno CD3 correspondiente. La supresión de una porción del extremo amino-terminal del dominio II de PE incrementa la actividad citotóxica, en comparación con el uso de las moléculas PE nativas, o aquellas en donde no se haya presentado ninguna supresión significativa del dominio II. Otras modificaciones incluyen una secuencia carboxi-terminal

apropiada para la molécula PE recombinante, para ayudar a translocalizar la molécula en el citosol de las células blanco. Las secuencias de aminoácidos que se han encontrado efectivas incluyen REDLK (SEQ ID NO:6) (como en la PE nativa), REDL (SEQ ID NO:7), o KDEL (SEQ ID NO:8) (como en PE38KDEL discutido anteriormente), repeticiones de éstas, u otras secuencias que funcionen para mantener o reciclar las proteínas en el retículo endoplásmico, ver la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,489,525, incorporada como referencia. Otros mutantes pueden comprender sustituciones de un solo aminoácido (por ejemplo, el reemplazo de Lys con Gln en las posiciones 590 y 606).

Los mutantes de PE adicionales que tienen fracciones de reconocimiento insertadas en el Dominio III de PE, se describen en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,458,878, incorporada como referencia.

3. **Construcción de Inmunotoxinas**

Esta invención incluye fusiones de un dominio de enlace de CD3 con uno o más mutantes de *Pseudomonas;* y también incluye fusiones de inmunotoxina que comprenden dos o más dominios de enlace de CD3 y cuando menos un mutante de PE.

El término "fusionado" o "fusión", como se emplea en la presente, se refiere a polipéptidos en donde:

(i) un "primer dominio del polipéptido" está

enlazado en su término carboxilo mediante un enlace químico (es decir, péptido) con el término amino de un "segundo dominio del polipéptido", opcionalmente mediante un conector de péptido, o inversamente, en donde:

(ii) el "segundo dominio del polipéptido" de (i) está enlazado en su término carboxilo mediante un enlace químico (es decir, péptido) con el término amino del "primer dominio del polipéptido de (i), opcionalmente mediante un conector de péptido.

De una manera similar, "fusionado", cuando se utiliza en relación con los intermediarios de polinucleótidos de la invención, significa que el término 3' [o inversamente, 5'] de una secuencia de nucleótidos que codifica un primer dominio funcional, está enlazado con el término 5' [o inversamente, 3'] respectivo de una secuencia de nucleótidos que codifica un segundo dominio funcional, ya sea directamente por medio de un enlace químico (es decir, covalente), o indirectamente por medio de una secuencia de nucleótidos conectora que por sí misma está químicamente (es decir, covalentemente) enlazada a la primera secuencia de nucleótidos que codifica el dominio funcional, y a la segunda secuencia de nucleótidos que codifica el dominio funcional, mediante sus términos.

Se pueden seleccionar secuencias de péptido adicionales que formen las fusiones, a partir de proteínas humanas de longitud completa o truncadas (por ejemplo, fragmentos

extracelulares solubles de las mismas). Los ejemplos de estas secuencias de péptido incluyen dominios de proteína de inmunoglobulina humana, dominios de otras proteínas de suero humano, u otros dominios que se puedan multimerizar (Kostelny y colaboradores, J. Immunol. 148:1547-1553 (1992); Publicación Internacional Número WO 93/11162; Pack y Plückthun; Biochemistry 31:1579-1584 (1992); Hu y colaboradores, Can. Res. 56:3055-3061 (1996); Publicación Internacional Número 94/09817; Pack y colaboradores, J. Mol. Biol. 246:28-34 (1995)]. Estos dominios funcionales adicionales también pueden servir como conectores de péptido, por ejemplo, uniendo el dominio de enlace de antígeno CD3 con el componente PE; o alternativamente, estos dominios adicionales se pueden localizar en cualquier otra parte de la molécula de fusión, por ejemplo, en sus términos amino o carboxilo.

En una modalidad preferida de la invención, un Fv de una sola cadena de un anticuerpo anti-CD3 se fusiona con un fragmento truncado de PE que tenga funciones de translocación y catalítica, pero que carezca sustancialmente de capacidad de enlace celular.

De preferencia, las regiones de enlace de anticuerpo que reconocen el antígeno CD3 se pueden insertar en reemplazo del dominio suprimido Ia de la molécula PE. Por consiguiente, en las diferentes modalidades de la invención, se prefiere que la fracción de enlace de CD3 se enlace por medio de su término

carboxilo (opcionalmente a través de un péptido conector u otro dominio funcional) con el término amino del componente de toxina PE.

De una manera alternativa, el componente de toxina PE se puede enlazar mediante su término carboxilo con el término amino de la fracción de enlace de CD3 (también opcionalmente mediante un péptido conector u otro dominio funcional).

Cuando hay múltiples dominios de enlace de CD3 sobre una sola cadena, éstos se pueden enlazar en hilera, o se pueden separar mediante el componente PE, un enlazador, u otra fracción funcional.

Cualquier conector de péptido que enlace la región de enlace de CD3 y el componente PE de preferencia permite un pliegue y actividad independiente del dominio de enlace de CD3; es libre de una propensión a desarrollar una estructura secundaria ordenada que pueda interferir con el dominio de enlace de CD3, u ocasionar una reacción inmunológica en el paciente, y tiene una característica hidrofóbica o cargada mínima que pueda interactuar con el dominio de enlace de CD3. El conector es de preferencia de 1 a 500 aminoácidos; más preferiblemente de 1 a 250; y todavía más preferiblemente no mayor de 1 a 100 (por ejemplo, 1-25, 1-10, 1-7, ó 1-4) aminoácidos.

Para cada una de las preferencias anteriores, el conector es de preferencia lineal.

En general, los péptidos conectores que enlazan el dominio de enlace de CD3 y el componente PE, que comprenden aminoácidos pequeños no cargados, se puede esperar que satisfagan los criterios para este conector. Por ejemplo, el péptido conector en sc(UCHT-1)-PE38 es Lys-Ala-Ser-Gly-Gly (KASGG) (SEQ ID NO:9). También pueden ser útiles otros péptidos de diferentes longitudes y composición de secuencia.

De una manera más preferible, la inmunotoxina de la invención es un polipéptido de una sola cadena que comprende la región Fv (o su fragmento de enlace de CD3) de UCHT-1 fusionada por medio de su término carboxilo, opcionalmente mediante un péptido conector, con el término amino de PE38.

scFv(UCHT-1)-PE38 es una proteína de 600 aminoácidos, que tiene un peso molecular predicho de 64,563 dáltones (64.5 kD).

Se observará que el producto de traducción real a partir de *E. coli* de la molécula anterior puede comprender un residuo de metionina (Met) N-terminal agregado, debido a la disociación incompleta del Met normalmente suministrado a una secuencia codificadora para iniciar la transcripción desde *E. coli*. Adicionalmente, el polipéptido scFv(UCHT-1)PE38 preparado de acuerdo con el Ejemplo 1, puede contener una alanina (Ala) agregada en el término N o en la posición 2 (es decir, en seguida de Met) como un resultado de la secuencia agregada en el término N para facilitar la clonación. El término amino

maduro de la región variable de la cadena ligera de UCHT-1 se inicia en la posición 3 de la SEQ ID NO:2 es decir, ácido aspártico (Asp). De acuerdo con lo anterior, la expresión por *E. coli* de la molécula, como se prepara de acuerdo con el Ejemplo 1, puede producir uno o más de los siguientes productos funcionalmente equivalentes, dependiendo de la tensión de expresión utilizada, y de las condiciones precisas de fermentación y purificación utilizadas: el polipéptido que tiene la secuencia 1-601 de la SEQ ID NO:2, y codificado por los nucleótidos 1-1803 de la SEQ ID NO:1; el polipéptido que tiene la secuencia 2-601 de la SEQ ID NO:2, y codificado por los nucleótidos 4-1803 de la SEQ ID NO:1; y el polipéptido que tiene la secuencia 3-601 de la SEQ ID NO:2, y codificado por los nucleótidos 7-1803 de la SEQ ID NO:1.

Se entenderá que cualquiera de estas formas de la proteína (o el ácido nucleico correspondiente) son abarcadas por el término "scFv(UCHT-1)-PE38", como se emplea en la presente, a menos que se indique de otra manera.

Esta invención también abarca polipéptidos que son cuando menos el 80 por ciento idénticos a, y más preferiblemente cuando menos el 90 por ciento idénticos a, y todavía más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento idénticos a, el polipéptido que tiene la SEQ ID NO:2, en donde el término "idéntico a" tiene el significado previamente indicado.

Ciertas moléculas de inmunotoxina pueden ser "dimerizadas" por las fuerzas de atracción entre los dominios localizados sobre las cadenas del polipéptido, o mediante la formación de enlaces de disulfuro entre los residuos de cisteína. Por ejemplo, se puede formar un dímero a partir de dos cadenas de polipéptido, o a partir de dos pares de cadenas. Los dímeros pueden ser homodímeros o heterodímeros (un ejemplo de un heterodímero es una construcción en donde está presente la toxina PE solamente sobre una de dos cadenas). Ciertas construcciones de inmunotoxina de una sola cadena divalentes, o construcciones dimerizadas, de acuerdo con la invención, se ilustran en la Figura 1. Las construcciones de inmunotoxina dimerizadas ilustradas en las Figuras 1A, C, D, E, y F comprenden dos (o más) cadenas. La construcción ilustrada en la Figura 1B es una imunotoxina divalente de una sola cadena. Las moléculas mostradas en la Figura 1E son anticuerpos recombinantemente preparados de longitud completa enlazados con una toxina. La construcción de la Figura 1F es un fragmento $F(ab')_2$ recombinantemente preparado (es decir, que comprende un dímero de dos pares de cadena) enlazado con la toxina. La toxina PE en las construcciones ilustradas en la Figura 1, es de preferencia PE38, y los dominios variables del anticuerpo se pueden derivar a partir de UCHT-1.

En particular, una primera modalidad ilustrativa de una inmunotoxina dimérica de la invención es un diacuerpo, como se

ilustra en la Figura 1A. "Diacuerpo" significa una construcción de inmunotoxina que comprende dos cadenas únicas (de preferencia idénticas), comprendiendo cada cadena los dominios V_L y V_H y una toxina mutante PE, llegando estas cadenas a asociarse debido a las fuerzas de atracción entre los dominios variables (por ejemplo, enlace de hidrógeno, no representado en la Figura 1A), en lugar de hacerlo mediante enlace de disulfuro. La Figura 1A ilustra un par de cadenas únicas que tienen la configuración V_L-L-V_H-toxina mutante PE, como se muestra.

En contraste con la inmunotoxina de una sola cadena, para los propósitos de prevenir la formación de Fv intra-cadenas, el enlazador L entre los dominios V_L y V_H en cada cadena de polipéptido de un diacuerpo, de preferencia es sustancialmente inflexible, y en general no es mayor de 10 aminoácidos, y más preferiblemente no es mayor de 1 a 5 aminoácidos, como se ejemplifica por el enlazador: $(Gly)_4Ser$ (SEQ ID NO:10), e inclusive puede estar enteramente ausente. En contraste, el enlazador entre V_L y V_H en una inmunotoxina de una sola cadena de preferencia es de cuando menos aproximadamente 14 aminoácidos). Por consiguiente, la región Fv funcional de un diacuerpo se forma realmente mediante la interacción de las dos cadenas entre sí. Los diacuerpos se pueden expresar a partir de células de mamífero, así como de *E. coli*. La construcción del diacuerpo ha sido en general descrita por Hollinger y

colaboradores [Proc. Nat. Acad. Sci. 90:6444 (1993)] y Wu y colaboradores [Immunotech 2:21 (1996)].

En otra modalidad ilustrativa de la invención, una construcción de una sola cadena en hilera, como se ilustra en la Figura 1B, comprende dos regiones Fv anti-CD3 consecutivamente enlazadas en serie, es decir, mediante un enlace de péptido, o mediante un enlazador de péptido que es opcionalmente flexible. La Figura 1B ilustra una construcción que tiene la configuración: V_L-L-V_H-X-V_L-L-V_H-Y-Toxina, en donde X e Y se seleccionan independientemente a partir de un enlace de péptido o enlazador. En particular, L puede ser un enlazador, es decir $(GGGS)_4$, SEQ ID NO:5, y cada uno de X e Y puede tener una secuencia, tal como aquella del "conector" (es decir, KASGG, SEQ ID NO:9). Los dominios V_L y V_H de cada una de las dos regiones Fv están separados por un enlazador de péptido L que es flexible (representado en la Figura 1B, así como en las Figuras 1C y D, mediante una línea de ciclo que conecta cada dominio V_L y V_H), que tiene de preferencia de aproximadamente 10 a 30, y más preferiblemente de aproximadamente 14 a 25 aminoácidos. De preferencia, las dos regiones Fv de la construcción mostrada en la Figura 1B, son ambas dominios de enlace anti-CD3. Por lo tanto, en una modalidad, las regiones Fv pueden enlazarse al mismo epítopo de CD3, y pueden inclusive ser idénticas (o cada región o su secuencia de nucleótidos de codificación se puede modificar

para facilitar la expresión o inhibir la recombinación); o de una manera alternativa, cada Fv se puede seleccionar para enlazarse con un epítopo diferente sobre el antígeno CD3 humano. Un componente de toxina PE de la invención se puede enlazar (opcionalmente a través de enlazadores que intervengan o secuencias funcionales) con el término carboxilo o amino de uno de los dominios Fv. (De una manera alternativa, puede haber múltiples segmentos de la toxina PE presentes en la molécula). En la Figura 1B, la secuencia PE está enlazada con el término carboxilo de uno de los dominios Fv.

Las moléculas de anticuerpo de una sola cadena en hilera, en donde las regiones de enlace de antígeno se enlazan con diferentes antígenos, que hacen que estas moléculas sean "biespecíficas", son descritas en general por Gruber y colaboradores, [J. Immunol. 152:5368 (1994)]; Kurcucz y Segal [J. Immunol. 154:4576 (1995)], Mallender y colaboradores [J. Biol. Chem. 269:199 (1994)] y Mack y colaboradores [Proc. Nat. Acad. Sci. 92:7021 (1995)].

Todavía otra construcción de la invención se prepara a partir de dos cadenas de polipéptido, cada una comprendiendo un "dominio dimerizante", que sirve para facilitar la dimerización entre las cadenas mediante las fuerzas de asociación (por ejemplo, enlace de hidrógeno), en lugar de hacerlo mediante enlace de disulfuro. (Las fuerzas de asociación mencionadas están representadas por los puntos de la Figura 1C, así como en

la Figura 1D). Cada dominio dimerizante, ilustrado en la Figura 1C por un par de estrellas, se puede localizar internamente adentro de la cadena, por ejemplo, entre la región Fv y el componente de toxina PE (como se muestra); o en otro aspecto, el dominio dimerizante se puede localizar en el término N de la región Fv (no mostrada); y en todavía otro aspecto, el dominio dimerizante se puede localizar en el término C de la toxina PE (no mostrada). En la construcción ilustrada en la Figura 1C, cada cadena tiene la configuración: V_L-L-V_H-dominio dimerizante-toxina mutante PE.

Los dominios dimerizantes son descritos en general por Pack y Plückthum [Biochem. 31:1579 (1992)], y por Kostelny y colaboradores, *supra*. Los dominios dimerizantes adecuados se pueden derivar a partir de factores de transcripción heterodiméricos o hélices anfifílicas, y se expresan en células de mamífero así como en *E. coli*.

Otra construcción dimerizada de acuerdo con la invención se prepara a partir de inmunotoxinas de una sola cadena que comprenden la región de articulación y la tercera región constante ("CH3") de Ig, para efectuar la dimerización a través de la formación de enlaces de disulfuro y las fuerzas de atracción entre los segmentos CH3.

Como se muestra en la Figura 1D, una toxina de "minicuerpo" de la invención puede comprender dos cadenas únicas (por ejemplo idénticas), cada una de cuyas cadenas

comprende una región Fv enlazada por medio de articulación ("H") y CH3 de, por ejemplo, IgG1 humana, con el componente de la toxina PE. Cada uno de los óvalos ligeramente sombreados en la Figura 1D representa los dominios de articulación y CH3. Por consiguiente, cada cadena tiene la configuración: V_L-L-V_H-H+-CH3-toxina mutante PE. Las cadenas de polipéptido están enlazadas mediante enlaces de disulfuro (representados en la Figura 1D, así como en las Figuras 1E y F, por líneas gruesas), así como fuerzas de asociación (representadas por puntos), entre los dominios de articulación y CH3 respectivos. (Una construcción variante referida en la Figura 1D como "toxina de minicuerpo Δ" se muta para impedir el mal emparejamiento de las cisteínas, reemplazando la cisteína en la región de articulación, que ordinariamente empareja las cadenas pesada y ligera del anticuerpo nativo, con, por ejemplo, serina o alanina, y dejando intactas las dos cisteínas restantes en la articulación que enlazada las cadenas pesadas).

Otras variantes utilizan la articulación de otros isotipos de inmunoglobulina u otras especies de mamífero, por ejemplo, IgG de murino. Un "minicuerpo" ha sido en general descrito por Hu y colaboradores [Can. Res. 56:3055 (1996)].

Otra construcción ilustrativa de acuerdo con la invención comprende un anticuerpo recombinante fusionado mediante el término C de la cadena pesada (Figura 1E, panel izquierdo), o de la cadena ligera (Figura 1E, panel derecho),

40

con una toxina PE mutante de acuerdo con la invención. Como en el anticuerpo nativo, las cadenas se enlazan mediante enlaces de disulfuro (líneas gruesas que conectan las cadenas), como se muestran. Estas toxinas de anticuerpo de longitud completa generalmente se dimerizan en pares. En estas construcciones, se puede utilizar una Ig de enlace que no sea del receptor huFcγ, tal como IgG2b de murino o IgG_4 humana, para sustituir al Fc nativo. Opcionalmente, puede haber un componente de toxina PE presente sobre ambas cadenas pesada y ligera (no mostradas).

Una construcción adicional de acuerdo con la invención comprende un fragmento F(ab')2 recombinantemente preparado (que incluye la región de articulación indicada), que se enlaza mediante el término carboxilo de la cadena pesada (Figura 1F, panel izquierdo) o de la cadena ligera (Figura 1F, panel derecho) opcionalmente mediante un enlazador, no mostrado), con una toxina PE mutante. Estas moléculas de toxina $F(ab')_2$ generalmente se dimerizan en pares. (Los óvalos ligeramente sombreados de la Figura 1F representan el dominio constante de la cadena pesada ("C_H"), o el dominio constante de la cadena ligera ("C_κ"), como se indica. Las regiones de articulación de la cadena de polipéptido están representadas por separado de las regiones constantes mediante los conectores enlazados con disulfuro marcados con "articulación". Por consiguiente, las cadenas respectivas tienen la configuración VL- C_κ y V_H-C_{H1}-articulación-toxina PE (Figura 1F, izquierda), o de una manera

alternativa, VL- C_k-toxina PE y V_H-C_{H1}-articulación (Figura 1F, derecha).

Las construcciones anteriores se pueden preparar a partir de materiales de partida conocidos, mediante técnicas de ingeniería recombinante conocidas por los expertos en la materia.

La invención también pretende incluir homólogos de polipéptido (y las moléculas de ADN que codifican estos polipéptidos), que difieren de una especie dada a conocer del polipéptido por tener, por ejemplo sustituciones conservadoras en los aminoácidos sobre el polipéptido dado a conocer, o supresiones o adiciones menores de residuos que no afectan de otra manera sustancialmente la capacidad de enlace de CD3 o la actividad catalítica de la inmunotoxina.

"Sustitución conservadora" significa la sustitución de uno o más aminoácidos por otros que tengan propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de polipéptidos espere que cuando menos la estructura secundaria, y de preferencia la estructura terciaria del polipéptido, quede sustancialmente sin cambios. Los reemplazos conservadores son en general aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los reemplazos de aminoácidos típicos incluyen alanina o valina por glicina, asparagina por glutamina, serina por treonina, y arginina por lisina.

También, dentro del alcance de esta invención, están los homólogos de las especies de inmunotoxina dadas a conocer en la presente.

El término "homólogo" u "homología" se refiere a la similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico. La homología se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que pueda quedar alineada para propósitos de comparación. Cuando una posición en la secuencia comparada está ocupada por la base o aminoácido idéntico, entonces las moléculas son homólogas en esa posición. Un grado de homología entre las secuencias es una función del número de posiciones de acoplamiento u homólogas compartidas por las secuencias.

De preferencia, cualquier homólogo de una especie de polipéptido de inmunotoxina de la invención es cuando menos 80 por ciento idéntico a, y de preferencia cuando menos del 90 por ciento idéntico a, y más preferiblemente cuando menos el 95 por ciento idéntico a, ese polipéptido de imunotoxina de la invención.

Todos los aminoácidos de los polipéptidos de la invención (con la excepción de glicina) de preferencia son L-aminoácidos que se presentan naturalmente.

También, dentro del alcance de esta invención, están los polinucleótidos aislados (por ejemplo, ADNc), que codifican los polipéptidos de inmunotoxina recombinantes de la invención

y sus homólogos, y en particular polinucleótidos que codifican sc(UCHT-1-PE38 que tienen los residuos 1-601, 2-601, ó 3-601 de la SEQ ID NO:2, o fragmentos de sc(UCHT-1)-PE38 que tienen cuando menos 100 (y de preferencia cuando menos 200) aminoácidos.

Esta invención incluye no solamente el ácido nucleico ilustrado en la SEQ ID NO:1, sino también ácidos nucleicos aislados que codifican el polipéptido de la SEQ ID NO:2, o un fragmento del mismo, y que tienen una secuencia que difiere de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO:1, debido a la degeneración del código genético; así como cadenas complementarias de los ácidos nucleicos anteriores.

Otro aspecto de la invención proporciona un polinucleótido (que tiene de preferencia cuando menos 300 bases (nucleótidos), y más preferiblemente cuando menos 600 bases, y todavía más preferiblemente cuando menos 900 bases), que se hibrida en un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención, tal como el polipéptido de la SEQ ID NO:2. Esta reacción de hibridación se puede realizar bajo condiciones de baja o alta astringencia.

Las condiciones de astringencia apropiadas que promueven la hibridación del ADN (por ejemplo, 6.0 x cloruro de sodio/nitrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por un lavado de 2.0 x SSC a 50°C), son conocidas por los expertos en la materia, o se pueden encontrar en Current

Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3, 1-6,3.6. Por ejemplo, la concentración de sal en el paso de lavado, se puede seleccionar a partir de una baja astringencia de aproximadamente 2.0 x SSC a 50°C, hasta una alta astringencia de aproximadamente 0.2 x SSC a 50°C. En adición, la temperatura en el paso de lavado se puede incrementar desde condiciones de baja astringencia a la temperatura ambiente (RT), a aproximadamente 22°C, hasta condiciones de alta astringencia a aproximadamente 65°C. El término "condiciones de hibridación astringentes" pretende significar la incubación durante la noche a 42°C en una solución que comprende: formamida al 50 por ciento, 5 x SSC NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM, fosfato de sodio 50 mM (pH de 7.6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 por ciento, y 20 microgramos/mililitro de ADN de esperma de salmón desgarrado y desnaturalizado, seguido por lavado de los filtros en 0.1 x SSC a aproximadamente 65°C.

Polinucleótidos "aislados" significa una molécula de ácido nucleico, ADN ó ARN, que se ha removido de su medio ambiente nativo. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinantes contenidas en un vector se consideran aisladas para los propósitos de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas incluyen moléculas de ADN recombinantes mantenidas en células hospederas heterólogas, o moléculas de ADN (parcialmente o sustancialmente) purificadas

en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcripciones de ARN in vivo o in vitro de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la presente invención incluyen además las moléculas producidas sintéticamente.

La invención también incluye oligonucleótidos aislados que codifican los péptidos conectores y/o el enlazador de la invención. Estos oligonucleótidos deben estar "fusionados en el marco" con los polinucleótidos que codifiquen el dominio de enlace de CD3 y el componente PE, y de preferencia incluyen sitios de restricción únicos en la molécula.

"Fusionado en el marco" significa que: (1) no hay ningún cambio en el marco de lectura del dominio de enlace de CD3 o del componente PE, ocasionado por el oligonucleótido enlazador; y (2) no hay terminación de traducción entre los marcos de lectura del dominio de enlace de CD3 y el componente PE.

Esta invención abarca además proteínas fisiológicamente funcionales equivalentes de los polipéptidos de fusión novedosos, que son intermediarios en la síntesis de los polipéptidos novedosos. El término "fisiológicamente funcional equivalente" se refiere a una molécula más grande que comprende el polipéptido de fusión de la invención, al que se ha agregado la secuencia de aminoácidos que es necesaria o deseable para una expresión y secreción efectiva del polipéptido de fusión

recombinante maduro de la invención a partir de una célula hospedera particular. Esta secuencia agregada está normalmente en el término amino de la proteína madura, y normalmente constituye una secuencia líder (es decir, señal) que sirve para dirigir las proteínas hacia la trayectoria secretora, y normalmente se disocia de la proteína en o antes de la secreción de la proteína desde la célula. La secuencia de señal se puede derivar a partir de la región N-terminal natural de la proteína pertinente, o se puede obtener a partir de genes hospederos que codifiquen las proteínas secretadas, o se puede derivar a partir de cualquier secuencia que se sepa que incrementa la secreción del polipéptido de interés, incluyendo secuencias sintéticas y todas las combinaciones entre una región "pre" y una "pro". La unión entre la secuencia de señal y la secuencia que codifica la proteína madura debe corresponder con un sitio de disociación en el hospedero.

En los polipéptidos de la invención, en donde una región de enlace de CD3 conduce la expresión, es decir, está corriente arriba de otras secuencias codificadoras en la molécula de fusión, puede ser conveniente utilizar una secuencia de señal para obtener efectivamente la expresión a partir de sistemas de mamífero (por ejemplo, CHO, COS), o de levadura (por ejemplo, *P. Pastoris*). Sin embargo, la secuencia de señal adicional no es necesariamente aquella de la cadena de inmunoglobulina nativa, y se puede obtener de cualquier fuente

adecuada, en el entendido de que sea adecuada para efectuar la expresión/secreción del polipéptido maduro a partir de la célula hospedera particular.

La adición de otras secuencias para facilitar la purificación en el término amino o carboxilo de la proteína, se contempla como parte de la invención. Los ejemplos de estas secuencias incluyen rótulos de poli-histidina para la purificación sobre resinas de afinidad de níquel, y secuencias de péptido para el reconocimiento por los anticuerpos contra c-myc, o hemaglutinina (HA). Estos "rótulos" de péptido son familiares para los expertos en este campo.

En los polipéptidos de inmunotoxina de la invención, en donde un componente de toxina PE conduce la expresión, una secuencia líder adecuada puede comprender la secuencia líder de exotoxina-A de PE nativa (SEQ ID NO:4), para realizar la secreción del polipéptido heterólogo maduro a partir de *E. coli*, de células de mamífero (por ejemplo, CHO, COS), o de levadura. Sin embargo, otra secuencia líder, no necesariamente nativa para PE o para la célula hospedera, puede proporcionar una expresión efectiva de la proteína de fusión madura en ciertos hospederos.

4. <u>Métodos para la Preparación de Inmunotoxinas Recombinantes de la Invención.- En general.</u>

a. Preparación del anticuerpo derivado de la fracción de

enlace de CD3: la estrategia general para la clonación de una o más regiones de un anticuerpo empieza extrayendo el ARN de las células de hibridoma, y transcribiendo inversamente el ARN utilizando hexámeros aleatorios como cebadores.

En particular, con el objeto de clonar el fragmento Fv de un anticuerpo, cada uno de los dominios V_H y V_L se amplifica mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Las secuencias de cadena pesada se pueden amplificar utilizando cebadores del extremo 5′ diseñados de acuerdo con las secuencias de proteína amino-terminales de la cadena pesada, y cebadores 3′ de acuerdo con las secuencias de la región constante de inmunoglobulina en consenso (Kabat y Wu, *supra*). Las regiones Fv de cadena ligera se amplifican utilizando los cebadores del extremo 5′ diseñados de acuerdo con las secuencias de proteína amino-terminales de la cadena ligera del anticuerpo, y en combinación con el cebador C-kappa. Los cebadores adecuados para aislar la región Fv de UCHT-1 se mencionan en el Ejemplo 1, aunque un experto en la materia reconocería que se pueden derivar otros cebadores adecuados a partir de los listados de secuencias proporcionados en la presente.

Los productos crudos de la reacción en cadena de la polimerasa se subclonan en un vector de clonación adecuado. Se identifican los clones que contengan el inserto del tamaño correcto mediante restricción del ADN. La secuencia de

nucleótidos de las regiones codificadoras de cadena pesada o ligera, se pueden determinar entonces a partir del ADN del plásmido de doble cadena, utilizando cebadores de secuenciamiento adyacentes al sitio de clonación. Se pueden utilizar los estuches comercialmente disponibles (por ejemplo, el estuche Sequenase, U.S. Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, EUA), para facilitar el secuenciamiento del ADN.

También se apreciará que, dada la información de secuencia dada a conocer en la presente, un experto ordinario en este campo puede preparar fácilmente ácidos nucleicos que codifiquen estas secuencias utilizando métodos bien conocidos. Por consiguiente, el ADN que codifica las regiones Fv se puede preparar mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, técnicas de amplificación, tales como reacción en cadena de la ligasa (LCR), y réplica de secuencia auto-sostenida, clonación y restricción de las secuencias apropiadas, o síntesis química directa, tal como mediante el método de fosfotriéster, el método de fosfodiéster, el método de dietilfosforamidita, y el método de soporte sólido.

La síntesis química produce un oligonucleótido de una sola cadena. Este se puede convertir en el ADN de doble cadena mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una polimerasa de ADN, utilizando la única cadena como una plantilla. Mientras que es posible sintetizar químicamente una región Fv de una sola cadena

entera, es preferible sintetizar un número de secuencias más cortas (de aproximadamente 100 a 150 bases) que posteriormente se liguen entre sí.

De una manera alternativa, las subsecuencias se pueden clonar, y las subsecuencias apropiadas se pueden disociar utilizando enzimas de restricción apropiadas. Luego se pueden ligar los fragmentos para producir la secuencia de ADN deseada.

Una vez que se obtiene el ADN de cadena ligera y pesada variable del Fv, las secuencias se pueden ligar entre sí, ya sea directamente o a través de una secuencia de ADN que codifique un enlazador de péptido, o mediante reacción en cadena de la polimerasa, utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en este campo. En una modalidad preferida, las regiones de cadena pesada y ligera se conectan mediante un enlazador de péptido flexible que empieza en el extremo carboxilo del dominio Fv de cadena ligera, y termina en el término amino del dominio Fv de cadena pesada. La secuencia entera codifica el dominio Fv en la forma de una fracción de enlace de CD3 de una sola cadena.

b. Fusión de la región de enlace de CD3 y componente PE: la región Fv se puede fusionar directamente con la fracción de toxina, o se puede unir a través de un péptido conector. El péptido conector se puede emplear simplemente para proporcionar espacio entre el anticuerpo y la fracción de toxina, o para

facilitar la movilidad entre estas regiones, para hacer posible que cada una obtenga su conformación óptima. La secuencia de ADN que comprende el péptido conector también puede proporcionar secuencias (tales como sitios cebadores o sitios de restricción), para facilitar la clonación, o puede conservar el marco de lectura entre la secuencia que codifique el anticuerpo y la fracción de toxina.

En general, la clonación de una proteína de fusión de inmunotoxina de acuerdo con la invención implica preparar por separado el ADN que codifique la fracción de enlace de CD3, y el ADN que codifique la fracción de toxina PE, y recombinar las secuencias de ADN en un plásmido u otro vector para formar una construcción que codifique la proteína de fusión deseada particular. El vector puede ser un plásmido de expresión que contenga la secuencia apropiada del promotor, etcétera, o el fragmento de ADN que codifique la inmunotoxina se puede transferir subsecuentemente a un plásmido de expresión. Otro planteamiento implica insertar el ADN que codifique la fracción de enlace de CD3 en una construcción que ya codifique la fracción de toxina PE.

c. Expresión de la inmunotoxina recombinante: las proteínas de la invención se pueden expresar en una variedad de células hospederas, incluyendo *E. coli*, otras hospederas bacterianas, levadura, y diferentes células eucarióticas

52

superiores, tales como las líneas celulares COS, CHO, y HeLa, y las líneas celulares de mieloma. El gen de la proteína recombinante se enlazará operativamente a las secuencias de control de expresión apropiadas para cada hospedera. Para *E. coli*, éste incluye un promotor, tal como los promotores T7, trp, tac, lac, o lambda, un sitio de enlace de ribosoma, y de preferencia una señal de terminación de transcripción. Para las células eucarióticas, las secuencias de control incluirán un promotor, y de preferencia un mejorador derivado a partir de los genes de inmunoglobulina, SV40, citomegalovirus, etcétera, y una secuencia de poliadenilación, y puede incluir secuencias donadora y aceptora de empalme.

Tanto la toxina de difteria como la exotoxina de *Pseudomonas*, impiden la síntesis de la proteína en las células eucarióticas mediante ribosilación de ADP del factor de elongación-2 (EF-2), un factor de traducción eucariótico esencial. Por consiguiente, para la expresión eucariótica, es preferible que se utilicen células en donde el EF-2 esté mutado, y por consiguiente, que sean resistentes a la ribosilación de ADP mediante la exotoxina P. Estos hospederos mutantes y proteínas EF-2 mutantes se han descrito tanto para células de mamífero [Moehring y colaboradores, Somatic Cell Genetics 5:469-480 (1979); Kohno y colaboradores, J. Biol. Chem. 262:12298-12305 1987)], como de levadura [Phan y colaboradores, J. Biol. Chem. 268:8665-8668 (1993); Kimata y

colaboradores, Biochem. Biophys. Res. Commun. 191:1145-1151 (1993)].

Los plásmidos de la invención se pueden transferir a la célula hospedera seleccionada mediante métodos bien conocidos, tales como transformación con cloruro de calcio para *E. coli*, y tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para células de mamífero. Las células transformadas por los plásmidos se pueden seleccionar por la resistencia a los antibióticos conferida por los genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes amp, gpt, neo, y hyg.

Se puede advertir que se pueden hacer modificaciones a la región Fv de una sola cadena y a las proteínas de fusión que comprenden la región Fv de una sola cadena, sin disminuir su actividad biológica. Se pueden hacer algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión, o incorporación de la región Fv de una sola cadena en una proteína de fusión. Estas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, una metionina agregada al término amino para proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales colocados sobre cualquier término para crear sitios de restricción convenientemente localizados, o codones de terminación. Por ejemplo, los cebadores utilizados en el Ejemplo 1 introducen una secuencia que codifica una metionina iniciadora para la expresión en *E. coli*, y los sitios de restricción BamHI, XbaI, SalI, NcoI, y BstXI para facilitar

54

la clonación.

Una vez expresadas, las proteínas recombinantes se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos convencionales de la materia, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel, y similares. Se prefieren las composiciones sustancialmente puras de cuando menos una homogeneidad de aproximadamente el 90 al 95 por ciento, y se prefieren más las composiciones que tengan una homogeneidad del 98 al 99 por ciento, o mayor del 99 por ciento, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad deseada, los polipéptidos deben estar sustancialmente libres de endotoxina para propósitos farmacéuticos, y se pueden utilizar terapéuticamente.

Un experto en este campo reconocería que, después de la síntesis química, de la expresión biológica, o de la purificación, la región Fv de una sola cadena o una proteína de fusión que comprenda una región Fv de una sola cadena, puede poseer una conformación sustancialmente diferente de aquella de la proteína nativa. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir la proteína, y luego hacer que la proteína se repliegue en la conformación preferida.

Los métodos para expresar los anticuerpos de una sola cadena y/o para desnaturalizar la proteína e inducir el repliegue hasta una forma plegada apropiada, incluyendo

anticuerpos de una sola cadena, a partir de bacterias tales como *E. coli*, se han descrito y son bien conocidos, y son aplicables a los polipéptidos de esta invención [Buchner y colaboradores, Analytical Biochemistry 205:263-270 (1992)]. En particular, con frecuencia se genera a proteína funcional a partir de *E. coli* o de otra bacteria, a partir de cuerpos de inclusión, y requiere de la solubilización de la proteína utilizando desnaturalizantes fuertes, y el repliegue subsecuente. En el paso de solubilización, debe estar presente un agente reductor para disolver los enlaces de disulfuro, como es bien conocido en este campo. Un regulador de ejemplo con un agente reductor es: Tris 0.1 M, pH de 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE 0.3 M (ditioeritritol). La reoxidación de los enlaces de disulfuro de la proteína se puede catalizar efectivamente en la presencia de reactivos de tiol de bajo peso molecular en una forma reducida y oxidada, como es descrito por Buchner y colaboradores, *supra*.

La renaturalización se realiza normalmente mediante dilución (por ejemplo, 100 veces) de la proteína desnaturalizada y reducida, en el regulador de repliegue. Se ha encontrado que la renaturalización en la presencia de GSSG 8 mM proporciona un producto altamente estable, reproducible. Un regulador de ejemplo para este propósito es Tris 0.1 M, pH de 8.0, L-arginina 0.5 M, glutationa oxidada 8 mM (GSSG), y EDTA 2 mM.

5. Usos Terapéuticos de las Inmunotoxinas Anti-CD3 Recombinantes

Los polipéptidos de inmunotoxina descritos en la presente se utilizan para efectuar cuando menos un agotamiento parcial de células T, con el objeto de tratar o prevenir las enfermedades o condiciones mediadas por células T del sistema inmune. Las inmunotoxinas se pueden utilizar en los métodos realizados in vivo, con el objeto de reducir sistémicamente las poblaciones de células T en un paciente. Las inmunotoxinas también se pueden utilizar ex vivo con el objeto de efectuar un agotamiento de células T de una población celular tratada.

Aplicaciones en Vivo

Está dentro del alcance de la presente invención proporcionar una profilaxis o un tratamiento de las enfermedades o condiciones mediadas por células T, mediante la administración de una inmunotoxina a un paciente en vivo, para el propósito de aniquilar sistémicamente las células T en el paciente, y como un componente de una preparación o régimen acondicionador, o un tratamiento de tolerancia a la inducción, en relación con el trasplante de médula ósea o de células de tallo, o el trasplante de órgano sólido, ya sea de una fuente humana (alo) o no humana (xeno).

Tanto los linfocitos B como T se originan en la médula ósea a partir de un progenitor linfoide común, la célula de

tallo pluripotente, pero solamente los linfocitos B maduran en la médula ósea. Los linfocitos T emigran hacia el timo para sufrir maduración, y luego entran a la corriente sanguínea, desde donde emigran hacia los tejidos linfoides periféricos. Los tejidos linfoides incluyen los órganos linfoides centrales, en donde se generan los linfocitos, y los órganos linfoides secundarios o periféricos, en donde se inician las respuestas inmunes adaptables. Los órganos linfoides centrales son la médula ósea y el timo. Los órganos linfoides periféricos incluyen los nodos linfáticos, el bazo, los tejidos linfoides asociados con el intestino, el tejido linfoide asociado con los broncos, y el tejido linfoide asociado con la mucosa (Janeway y Travers, *supra*, en §1-2).

Esta invención comprende un método de tratamiento o profilaxis de desórdenes mediados por células T en un paciente, el cual comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad agotadora de células T efectiva de una inmunotoxina de la invención. El agotamiento de los niveles de células T en la médula ósea, en la sangre periférica, y/o en los tejidos linfoides del paciente, puede disminuir la respuesta mediada por células T del paciente al antígeno, y asistir en la inducción de tolerancia. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden administrar útilmente a un paciente que sea, o que será, un receptor de un alotrasplante (o xenotrasplante), con el objeto de efectuar el agotamiento de

células T en el paciente, y de esta manera prevenir o reducir el rechazo de trasplante agudo o crónico mediado por células T de las células, el tejido, o el órgano alogeneicos (o xenogeneicos) trasplantados en el paciente, o para permitir el desarrollo de tolerancia inmunológica en las células, el tejido, o el órgano.

De preferencia, cuando se administra en vivo para prevenir o tratar el rechazo de trasplante de órgano, es deseable que la inmunotoxina se administre al paciente a través del tiempo en varias dosis. En general, se prefiere que cuando menos la primera dosis preceda a la cirugía del trasplante (de preferencia con tanta anticipación como sea posible), y se inicie una dosis o dosis subsecuentes en el momento de, o poco después en seguida de, la cirugía.

Las inmunotoxinas se pueden administrar en vivo, ya sea solas o en combinación con otros agentes farmacéuticos efectivos en el tratamiento de rechazo de trasplante agudo o crónico, incluyendo ciclosporina A, ciclosporina G, rapamicina, rapamicina 40-O-2-hidroxietil-sustituida RAD), FK-506, ácido micofenólico, micofenolato mofetil (MMF), ciclosfamida, axatiopreno, brequinar, leflunamida, mizoribina, desoxiespergualinas, clorhidrato de 2-amino-2-[2-(4-octilfenil)etil]-propano-1,3-diol (FTY 720), corticosteroides (por ejemplo, metotrexato, prednisolona, metilprednisolona, dexametazona), u otros compuestos inmunomoduladores (por

ejemplo, CTLA4-Ig); anticuerpos anti-LFA-1 ó anti-ICAM, u otros anticuerpos que impidan el co-estímulo de las células T, por ejemplo, anticuerpos para los receptores de leucocitos o sus ligandos (por ejemplo, los anticuerpos para MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD40, CD45, CD58, CD152, (CTLA-4), CD 154 (ligando CD40).

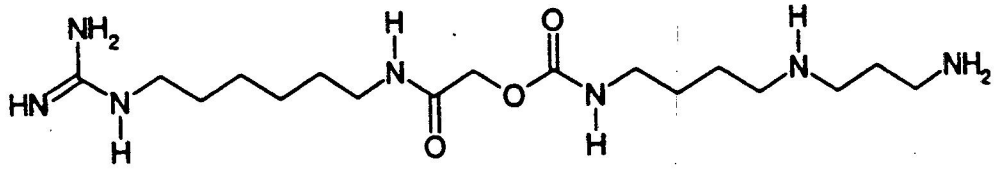
En particular, se puede lograr una aceptación prolongada del injerto, e inclusive una tolerancia inmunológica aparente, mediante la administración combinada de una inmunotoxina anti-CD3 de la invención, y un derivado de espergualina, tal como un compuesto de desoxiespergualina, u otro análogo de espergualina, y esta invención, en una modalidad preferida, comprende la administración combinada de la inmunotoxina anti-CD3 y un compuesto de desoxiespergualina, en un régimen de inducción de tolerancia; ver, por ejemplo, Eckhoff y colaboradores, el extracto presentado a la American Society of Transplant Surgeons, 15 de mayo de 1997, y Contreras y colaboradores, Transplantation 65:1159 (1998), ambos incorporados como referencia. El término "compuesto de desoxiespergualina" incluye 15-desoxi-espergualina (referida como "DSG", y también conocida como gusperimus), es decir, N-[4-(3-amino-propil)aminobutil]-2-(7-N-guanidinoheptanamido)-2-hidroxietanamida, y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,518,532, incorporada como referencia;

60

y en particular (-)-15-desoxiespergualina y sus sales farmacéuticamente aceptables, como se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 4,525,299, incorporada como referencia. Los isómeros de (S)-(-) ó (R)-(+)-15-desoxi-espergualina y sus sales se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,869,734 y en la Patente Europea Número EP 765,866, ambas incorporadas como referencia; y la forma de triclorhidrato de la DSG se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,162,581, incorporada como referencia.

Otros derivados de espergualina para utilizarse con la inmunotoxina anti-CD3 en un régimen de inducción de tolerancia incluyen los compuestos dados a conocer en las Patentes Números US 4,658,058; US 4,956,504; US 4,983,328; US 4,529,549; y EP 213,526, EP 212,606, todas incorporadas como referencia.

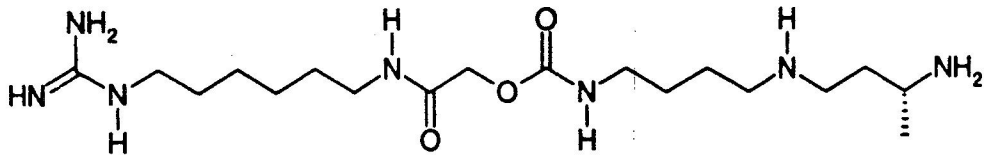
La invención, en una modalidad preferida adicional, comprende la administración combinada de una inmunotoxina antiCD3 de acuerdo con la invención, y todavía otros análogos de espergualina, tales como los compuestos dados a conocer en las Patentes Números US 5,476,870 y EP 600,762, ambas incorporadas como referencia, por ejemplo,



Compuesto(a)

61

es decir, 2-[[[4-[[3-(amino)propil]amino]butil]amino] carboniloxi]-N-[6-[(aminoiminometil)amino]hexil]acetamida ("tresperimus"), y sus sales de adición farmacéuticamente aceptables, con un ácido mineral u orgánico. Los compuestos dados a conocer en las Patentes Números US 5,637,613 y EP 669,316, ambas incorporadas como referencia, por ejemplo,



Compuesto (b)

Es decir, tris (trifluoroacetato) de 2-[[[4-[[3(R)-(amino)butil]amino]butil]amino-carboniloxi]-N-[6-[(aminoiminometil)amino]hexil]acetamida, y otras sales farmacéuticamente aceptables del mismo. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos anteriores incluyen sales con un ácido mineral o un ácido orgánico, incluyendo (con respecto a los ácidos minerales), ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, y fosfórico, y (con respecto a los ácidos orgánicos), fumárico, maleico, metansulfónico, oxálico, y cítrico;

Los compuestos dados a conocer en las Patentes Números US 5,733,928 y EP 743,300 ambas incorporadas como referencia;

Los compuestos dados a conocer en las Patentes Números US 5,883,132 y EP 755,380, ambas incorporadas como referencia;

62

y

Los compuestos dados a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,505,715 (por ejemplo, columna 4, línea 44 - columna 5, línea 45), incorporada como referencia.

"Administración combinada" significa el tratamiento del receptor del trasplante de órgano tanto con una inmunotoxina anti-CD3 de la invención, como el derivado o análogo de espergualina.

La administración de la inmunotoxina y el derivado o análogo de espergualina, no necesita realizarse de una manera simultánea, sino más bien puede estar separada en el tiempo. Sin embargo, normalmente, el transcurso de la administración de la inmunotoxina y el compuesto relacionado con espergualina se traslapará cuando menos hasta algún grado.

La dosis total de la inmunotoxina anti-CD3 de preferencia se da en dos a tres inyecciones, precediendo la primera dosis al trasplante por el máximo tiempo practicable, con inyecciones subsecuentes separadas por intervalos de, por ejemplo, aproximadamente 24 horas.

La inmunotoxina de preferencia se administra antes del trasplante, y en el tiempo de, y/o en seguida de, el trasplante. En el alotrasplante, la administración de la inmunotoxina anti-CD3 de preferencia precede a la cirugía de trasplante por aproximadamente 2 a 6 horas, mientras que para

63

el xenotrasplante o el alotrasplante relacionado con el ser vivo, la primera inyección de inmunotoxina anti-CD3 puede preceder al trasplante por tanto como una semana, ver, por ejemplo, Knechtle y colaboradores [Transplantation 63:1 (1997)]. En un régimen de inducción de tolerancia, el tratamiento con inmunotoxina de preferencia está limitado a no más de aproximadamente 14 días, y de preferencia a aproximadamente el día 7, o el día 5, o inclusive el día 3, después del trasplante.

El derivado o análogo de espergualina se puede administrar antes del trasplante, en el momento del trasplante, y/o en seguida del trasplante. La duración del tratamiento antes o después del trasplante puede variar.

En un régimen de inducción de tolerancia, el tratamiento con el compuesto derivado o análogo de espergualina de preferencia se retina no después de aproximadamente 120 días en seguida del trasplante, y más preferiblemente después de aproximadamente 60 días después del trasplante, y muy preferiblemente después de aproximadamente 30 días, y todavía más preferiblemente no después de 14, o inclusive de aproximadamente 10 días después del trasplante.

Por consiguiente, el término "administración combinada" incluye dentro de su alcance, un régimen de tratamiento en donde, por ejemplo, se administran una o más dosis de la inmunotoxina antes del trasplante, seguidas por una o más dosis

comenzando alrededor del tiempo del trasplante; junto con la administración del derivado o análogo de espergualina también antes de, y/o en el momento de, el trasplante, y continuando normalmente después del trasplante.

Se pueden incorporar corticosteroides, tales como metilprednisolona, en el régimen de administración combinada. Por ejemplo, la administración de esteroide puede comenzar antes del trasplante, y puede continuar con una o más dosis después.

La inmunotoxina anti-CD3 de la invención de preferencia se proporciona en una dosis suficiente para reducir el número de células T en un paciente por dos a tres registros. Una dosificación efectiva total para reducir el número de células T en un paciente por dos a tres registros de acuerdo con la presente, puede ser entre aproximadamente 50 microgramos/kilogramo y aproximadamente 10 miligramos/kilogramo de peso del cuerpo del sujeto, y más preferiblemente entre aproximadamente 0.1 miligramos/kilogramo y 1 miligramo-/kilogramo.

Un régimen de dosificación para un tratamiento de inducción con el derivado o análogo de espergualina puede ser entre 1 y 10 miligramos/kilogramo/día durante 0 a 30 días, óptimamente, por ejemplo, de aproximadamente 2.5 miligramos/kilogramo/día durante 15 días.

Se pueden administrar esteroides adicionales en el

momento de las inyecciones con inmunotoxina anti-CD3, por ejemplo, como un régimen reductor de metilprednisona, tal como 7 miligramos/kilogramo en el día de la cirugía del trasplante, 3.5 miligramos/kilogramo a las +24 horas, y 0.35 miligramos/kilogramo a las +48 horas. De una manera alternativa, la dosificación de esteroide se puede mantener constante, por ejemplo, un tratamiento con 40 miligramos/kilogramo de prednisona en el momento de la inyección de inmunotoxina. Se entiende que la cantidad exacta y la elección del esteroide pueden variar, de una manera consistente con la práctica clínica convencional.

En una modalidad preferida de la terapia de combinación de la invención, la inmunotoxina de la terapia combinada es scFv(UCHT-1)PE38, y es en particular una inmunotoxina que tenga la SEQ ID NO:1. Esta scFv(UCHT-)-PE38 de preferencia se co-administra con la 15-desoxiespergualina, y especialmente la (-)-15-desoxiespergualina. En otro aspecto, la scFv(UCHT-1)-PE38 se co-administra con el compuesto (a) anteriormente mencionado. En una modalidad todavía adicional, la scFv(UCHT-1)-PE38 se co-administra con el compuesto (b) anteriormente mencionado.

En la práctica de la terapia de combinación anterior, y los otros métodos de esta invención, en el contexto del xenotrasplante, y especialmente cuando el receptor del trasplante sea un ser humano, las células, tejidos, u órganos donadores de preferencia son porcinos, y más preferiblemente se

reclutan de cerdos transgénicos, por ejemplo que expresen DAF humana.

En otra modalidad de los métodos de la invención, las inmunotoxinas se pueden administrar en vivo a un receptor de médula ósea para profilaxis o tratamiento de la enfermedad del huésped contra el injerto, a través de la aniquilación de las células T del huésped (es decir, el receptor del trasplante de médula ósea). Los trasplantes de médula llegan a ser necesarios en el tratamiento de ciertas enfermedades, tales como leucemia, anemia aplástica, o ciertos desórdenes genéticos, en donde la propia médula del paciente está severamente dañada, o en donde la irradiación o quimioterapia del cuerpo total ha destruido el sistema hematopoyético del paciente. Estando ausente la reconstitución del sistema hematopoyético mediante el trasplante de médula ósea, el paciente llega a inmunodeprimirse severamente, y es susceptible a la infección.

El injerto estable de la médula ósea halogeneica del donador depende en gran parte del acoplamiento del complejo de histocompatibilidad mayor entre el donador y el receptor. En general, un mal acoplamiento solamente hasta el grado de uno o dos antígenos es tolerable en el trasplante de médula ósea, debido al rechazo del injerto de médula ósea disparado por las células T del receptor. (También, la enfermedad del injerto contra el huésped, descrita más adelante, es muy severa cuando existen mayores disparidades). En adición, un mal acoplamiento

menor convencionalmente necesita de un acondicionamiento del receptor mediante dosis letales o subletales de irradiación del cuerpo total o irradiación linfoide total, para agotar las células T del receptor. Este requerimiento de irradiación del paciente con trasplante de médula ósea, que hace al paciente totalmente o casi inmunoincompetente, presenta una limitación significativa sobre la aplicación clínica de trasplante de médula ósea a una variedad de condiciones de enfermedad en donde es potencialmente útil, incluyendo el trasplante de órgano sólido o celular, anemia de células débiles, talasemia, y anemia aplástica.

La presente invención resuelve este problema al proporcionar un medio dirigido para aniquilar a las células T del receptor en ausencia de radiación.

Por consiguiente, esta invención proporciona, en otro de sus aspectos, un método para acondicionar a un paciente de trasplante de médula ósea antes del injerto en el paciente de la médula ósea del donador, y/o de las células sanguíneas periféricas enriquecidas con células de tallo, el cual comprende la administración de una cantidad efectiva agotadora de células T de inmunotoxina al paciente. La inmunotoxina efectúa reducciones en la población de células T en el paciente, y de esta manera ejerce una profilaxis contra el rechazo por parte del huésped (es decir, el paciente) del injerto de médula ósea del donador. Los métodos para obtener

composiciones donadoras enriquecidas para células de tallo hematopoyéticas se dan a conocer en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica US 5,814,440, US 5,681,559, US 5,677,136, y US 5,061,620, todas incorporadas como referencia.

La enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), en particular, algunas veces es fatal, debilitando con frecuencia la complicación del trasplante alogenéico de médula ósea, que es mediado primariamente, si no es que exclusivamente, por los linfocitos T. La enfermedad del injerto contra el huésped es ocasionada por las células T del donador, que son adquiridas en el injerto por el receptor de la médula ósea, y que desarrollan una respuesta inmune contra el huésped. La enfermedad del injerto contra el huésped normalmente resulta de un acoplamiento inmunológico incompleto de los antígenos de leucocitos humanos (HLA) del donador y el receptor.

De acuerdo con lo anterior, esta invención también contempla un método de profilaxis o tratamiento de la enfermedad del injerto contra el huésped en un paciente con trasplante de médula ósea, el cual comprende la administración de una inmunotoxina de la invención al paciente durante el período inmediato después del trasplante, o cuando se llegan a manifestar los síntomas de la enfermedad del injerto contra el huésped, en una cantidad suficiente para efectuar reducciones en los niveles de células T en el huésped (es decir, el paciente), incluyendo las células T tanto del donador como del

huésped. El agotamiento temprano de las células T del donador y del huésped también facilita el desarrollo de quimerismo alogenéico; es decir, las células T a las que se da espacio para madurar en seguida de la ablación de las células T del huésped por la inmunotoxina , se hacen tolerantes de los antígenos tanto del donador como del huésped, y no participan en el rechazo del injerto contra el huésped. "Período inmediato después del trasplante" significa un período de uno o más días hasta aproximadamente dos semanas en seguida del trasplante de médula ósea.

En una modalidad adicional, la inmunotoxina anti-CD3 de la invención se puede administrar a un paciente que la necesite, para tratar todavía otras patologías mediadas por células T, tales como leucemias y linfomas de células T. Como se mencionó anteriormente, el tratamiento clínico de leucemias y linfomas de células T normalmente se apoya en la irradiación del cuerpo total, para aniquilar de una manera indiscriminada las células linfoides de un paciente, seguida por reemplazo de la médula ósea. Una inmunotoxina de la invención administrada a un paciente que sufra de leucemia/linfoma, puede reemplazar la radiación del cuerpo total con un medio selectivo para eliminar las células T.

En aspectos adicionales de la invención, las inmunotoxinas de la invención también se pueden administrar a un paciente en vivo, para tratar la enfermedad autoinmune

mediada por células T, tal como lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes tipo I, artritis reumatoide (RA), miastenia gravis, y esclerosis múltiple, mediante la ablación de poblaciones de células T en el paciente. Las inmunotoxinas también se pueden administrar a un sujeto afligido con una enfermedad infecciosa del sistema inmune, tal como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en una cantidad suficiente para agotar al paciente de células T infectadas, y de esta manera inhibir la réplica del VIH-1 en el paciente. Adicionalmente, la inmunotoxina anti-CD3 se puede administrar a los pacientes para tratar condiciones o enfermedades en los casos en los que la inmunosupresión crónica no sea aceptable, por ejemplo, facilitando los trasplante de islotes o de hepatocitos en pacientes con diabetes o enfermedades metabólicas, respectivamente. Las enfermedades y susceptibilidades que se pueden corregir con trasplantes de hepatocitos incluyen hemofilia, insuficiencias de al-antitripsina, e hiperbilirrubinemias.

En los métodos anteriores de la invención, el paciente es de preferencia un ser humano, y el donador puede ser alogenéico (es decir, un ser humano), o xenogenéico (por ejemplo, cerdos).

Para las aplicaciones en vivo, la inmunotoxina se administrará al paciente en una cantidad efectiva para aniquilar cuando menos a una porción de la población dirigida

de células que llevan CD3 (es decir, células T).

En general, una cantidad efectiva de inmunotoxina agotará una población dirigida de células T, es decir, en el sistema linfático y/o en la sangre periférica, por uno o más registros, y más preferiblemente por cuando menos aproximadamente dos registros, y todavía muy preferiblemente por cuando menos dos a tres registros. El modo de administración más efectivo y el régimen de dosificación dependen de la severidad y del curso de la enfermedad, de la salud del sujeto, y de la respuesta al tratamiento, y del juicio del médico que trate. Por consiguiente, las dosificaciones de las moléculas se deben titular para el sujeto individual.

De preferencia, en el tratamiento o en la profilaxis de la enfermedad del injerto contra el huésped que acompaña al trasplante de médula ósea, la inmunotoxina se administra al receptor del trasplante de médula ósea en una cantidad suficiente para reducir la población total de células T (es decir, las células T del donador más el receptor), presentes en la sangre y en los nodos linfáticos del paciente inmediatamente en seguida del trasplante de médula ósea, por cuando menos aproximadamente el 50 por ciento, y más preferiblemente cuando menos aproximadamente el 80 por ciento, y todavía muy preferiblemente cuando menos aproximadamente el 95 por ciento (por ejemplo el 99 por ciento), es decir, cuando menos dos

registros (por ejemplo, dos a tres registros).

Un régimen de dosificación adecuado para un receptor de médula ósea, para tratar o prevenir la enfermedad del huésped contra el injerto y/o la enfermedad del injerto contra el huésped, puede comprender la administración de la inmunotoxina inmediatamente antes de, y/o inmediatamente en seguida de, el trasplante de médula ósea, en cada día alternado durante el transcurso de seis días después del trasplante, para llegar a la dosis total de aproximadamente 10 a 500 microgramos/kilogramo, y más preferiblemente de 200 a 300 microgramos/kilogramo.

Para el tratamiento de leucemia/linfoma, la inmunotoxina se administra en una cantidad suficiente para reducir la población de células T en el tiempo de la administración por cuando menos aproximadamente el 50 por ciento, y más preferiblemente cuando menos aproximadamente el 80 por ciento, y muy preferiblemente cuando menos aproximadamente el 95 por ciento (por ejemplo, el 99 por ciento), es decir, cuando menos dos registros (por ejemplo, dos a tres registros).

Los niveles de células que llevan CD3, y en particular, de células T, en la médula ósea, en la sangre, o en los tejidos linfoides del paciente, se pueden ensayar mediante análisis FACS.

La efectividad del tratamiento con inmunotoxina en el

agotamiento de células T de la sangre periférica y de los órganos linfoides se puede determinar comparando los conteos de células T en muestras de sangre, y a partir del tejido linfoide macerado tomado de sujeto antes y después del tratamiento con la inmunotoxina. El agotamiento de células T puede ser seguido por citometría de flujo, como es descrita por Neville y colaboradores [J.Immunolther. 19:85-92 (1996)].

El agotamiento de los números de células T por dos registros, mediante una inmunotoxina químicamente conjugada comprendida de un anticuerpo monoclonal CD3 anti-Rhesus conjugado con una forma agotada del dominio de enlace celular de la toxina de difteria, ha demostrado que está asociado con la tolerancia al trasplante de los aloinjertos renales en monos Rhesus [Thomas y colaboradores, Transplantation 64:124-135 (1997); Knechtle y colaboradores, Transplantation 63:1-6 (1997)].

En general, una dosificación efectiva total para reducir el número de células T en un paciente por dos a tres registros de acuerdo con la presente, se puede describir mejor como entre aproximadamente 50 microgramos/kilogramo y aproximadamente 5 miligramos/kilogramo de peso del cuerpo del sujeto, y más preferiblemente entre aproximadamente 0.1 miligramos/kilogramo y 1 miligramo/kilogramo.

El paciente se puede tratar sobre una base diaria en administraciones sencillas o múltiples. La composición de

inmunotoxina también se puede administrar sobre una base mensual (o a intervalos semanales, según pueda ser apropiado), también en administraciones sencillas o múltiples.

Se prevé que, en el transcurso del estado de enfermedad, la dosificación y el tiempo de administración pueden variar. Las administraciones iniciales de la composición pueden ser en dosificaciones más altas dentro de las escalas anteriores, y se pueden administrar más frecuentemente que las administraciones posteriores en el tratamiento de la enfermedad.

Por ejemplo, el polipéptido es scFv(UCHT-1)-PE38 del Ejemplo 1, se puede administrar a un paciente de trasplante de riñón empezando justos antes del trasplante, y continuando, después del trasplante, durante el transcurso de una semana en una dosificación diaria o de días alternados, en una dosis de aproximadamente 0.3 a 10 miligramos por semana del polipéptido en el paciente promedio (70 kilogramos). Después de la primera semana después del trasplante, el régimen de tratamiento se puede reducir a semanas alternadas, siendo las dosificaciones de 0.1 miligramos a 1 miligramo de polipéptido por semana en el paciente promedio. Sin embargo, se espera que el tratamiento con la inmunotoxina se limite a cinco semanas después del trasplante, y más típicamente a tres semanas, o inclusive a una semana después del trasplante.

Aplicaciones Ex Vivo

También está dentro del alcance de la presente invención utilizar las inmunotoxinas para propósitos del agotamiento ex vivo de células T a partir de poblaciones de células aisladas removidas del cuerpo.

En un aspecto, las inmunotoxinas se pueden utilizar en un método para la profilaxis del rechazo de trasplante de órgano, en donde el método comprende perfundir el órgano del donador (por ejemplo, corazón, pulmón, riñón, hígado) antes del trasplante en el receptor con una composición que comprenda una cantidad efectiva agotadora de células T de la inmunotoxina, con el objeto de purgar el órgano de las células T secuestradas del donador.

En otra modalidad de la invención, las inmunotoxinas se pueden utilizar ex vivo en una terapia autóloga para tratar leucemia/linfoma de células T, u otras enfermedades o condiciones mediadas por células T, purgando las poblaciones celulares del paciente (por ejemplo, médula ósea) de células T cancerosas o afectadas de otra manera, con la inmunotoxina, y reinfundiendo la población celular agotada de células T en el paciente.

En particular, este método de tratamiento comprende:

(a) reclutar del paciente una población celular que comprenda células que lleven CD3 (por ejemplo, médula ósea);

(b) tratar la población celular con una cantidad efectiva

agotadora de células T de la inmunotoxina; y

(c) infundir la población celular tratada en el paciente (por ejemplo, en la sangre).

Una aplicación todavía adicional de esta terapia autóloga comprende un método para el tratamiento de un sujeto infectado con VIH, el cual comprende los pasos de:

(a) aislar una población celular del paciente que comprenda células T infectadas con VIH;

(b) tratar a la población celular aislada con una cantidad efectiva agotadora de células T de la inmunotoxina; y

(c) reintroducir la población celular tratada en el paciente.

De acuerdo con todavía otra modalidad de la invención, las inmunotoxinas se pueden utilizar ex vivo para los propósitos de efectuar el agotamiento de células T de una población celular de un donador, como una profilaxis contra la enfermedad del injerto con el huésped, e inducción de tolerancia, en un paciente que vaya a someterse a un trasplante de médula ósea. Este método comprende los pasos de:

(a) proporcionar una composición celular que comprenda médula ósea aislada y/o células sanguíneas periféricas enriquecidas con células de tallo de un donador adecuado (es decir, un donador alogenéico que tenga el acoplamiento apropiado de complejo de histocompatibilidad mayor o de antígenos de leucocitos humanos);

77

(b) tratar la composición celular con una cantidad efectiva de inmunotoxina para formar un inóculo cuando menos parcialmente agotado de células que lleven CD3 viables (es decir, células T); y

(c) introducir el inóculo tratado en el paciente.

En virtud del agotamiento de células T del inóculo del donador, las células T del donador que maduran en seguida del injerto, se hacen inmunológicamente tolerantes al huésped, y no iniciarán el rechazo del injerto contra el huésped.

De una manera conveniente, para los propósitos de las terapias ex vivo anteriormente descritas, la inmunotoxina se puede proporcionar en una concentración terapéutica muy en exceso de los niveles que se podrían realizar o tolerar en vivo. Por ejemplo, la inmunotoxina se puede incubar con células que expresen CD3 en cultivo en una concentración de aproximadamente 0.5 a 50,000 nanogramos/mililitro, con el objeto de aniquilar las células que lleven CD3 en ese cultivo.

Por lo tanto, se ha encontrado que la incubación de leucocitos de sangre periférica movilizados con citocina humanos (CMPBL, $5x10^6$/mililitro) en un medio de cultivo durante 1 hora a 25°C, con de 0.005 a 50 microgramos/mililitro de la inmunotoxina preparada en el Ejemplo 1, da como resultado el agotamiento del número de células $CD3^+$ presentes por aproximadamente 2.5 registros, y reduce la proliferación inducida por PHA hasta los niveles de fondo, medidos mediante

recuperación de ^{3}H-timidina.

En un aspecto adicional, los métodos terapéuticos ex vivo anteriores, se pueden combinar con la administración en vivo de la inmunotoxina, para proporcionar métodos mejorados para el tratamiento o la prevención del rechazo en pacientes de trasplante de médula ósea, y para lograr una tolerancia inmunológica.

Por ejemplo, un método que comprende tanto la administración in vivo como ex vivo de una inmunotoxina de la invención para la profilaxis y/o tratamiento de la enfermedad del huésped contra el injerto y/o de la enfermedad del injerto contra el huésped en un paciente que se va a someter a trasplante de médula ósea, comprende los pasos de:

(a) reducir los niveles de células que llevan CD3 viables (es decir, células T) en el paciente (es decir, a partir de la sangre periférica o del sistema linfático del paciente);

(b) proporcionar un inóculo que comprenda células hematopoyéticas (es decir, médula ósea y/o células de la sanguíneas periféricas enriquecidas con células de tallo) de un donador adecuado tratado con una cantidad efectiva agotadora de células T de la inmunotoxina; y

(c) introducir el inóculo en el paciente, y después administrar opcionalmente la inmunotoxina al paciente para agotar adicionalmente las células T del donador y del paciente.

El paso (a), es decir, el agotamiento de las células T

del paciente, se puede realizar mediante la administración en vivo de la inmunotoxina al paciente, y/o mediante una terapia autóloga que comprenda el tratamiento ex vivo de la médula ósea aislada del paciente, o de la sangre periférica, con la inmunotoxina, como se describió anteriormente.

Los métodos in vivo y ex vivo de la invención, como se describen anteriormente, son adecuados para el tratamiento de enfermedades curables o tratables mediante trasplante de médula ósea, incluyendo leucemias, tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia no linfoblástica aguda (ANLL), leucemia mielocítica aguda (AML), y leucemia mielocítica crónica (CML), linfoma de células T cutáneo, síndromes de inmunodeficiencia combinados severos (SCID), osteoporosis, anemia aplástica, enfermedad de Gaucher, talasemia, micosis fungoides (MF), síndrome de Sezany (SS), y otras anormalidades hematopoyéticas congénitas o genéticamente determinadas.

En particular, también está dentro del alcance de esta invención utilizar las inmunotoxinas como agentes para inducir una tolerancia específica del donador y específica del antígeno en relación con la terapia de células alogenéicas o xenogenéicas, o con trasplante de tejidos y órganos. Por consiguiente, la inmunotoxina se puede administrar como parte de un régimen acondicionador para inducir la tolerancia inmunológica en el paciente, a las células, tejido, u órgano del donador.

La tolerancia sistémica al trasplante específica del donador se ha logrado transitoriamente en modelos animales con el complejo de histocompatibilidad mayor mal acoplado, así como en seres humanos a través de quimerismo como un resultado de irradiación linfoide total de un receptor, seguida por trasplante de médula ósea con células del donador. Los animales reconstituidos exhiben quimerismo de múltiples linajes mixtos estable en su sangre periférica, conteniendo tanto células del donador como del receptor, de todos los linajes linfohematopoyéticos, incluyendo células T, células B, células aniquiladoras naturales, macrófagos, eritrocitos, y plaquetas. Además, las quimeras alogenéicas mixtas exhiben tolerancia específica del donador a los injertos de piel de tipo de donador, mientras que rechazan fácilmente los injertos de terceros. La tolerancia específica del donador también se confirma mediante ensayos in vitro, en donde se demuestra que los linfocitos obtenidos de las quimeras tienen actividades proliferativas y citotóxicas disminuidas contra las células alogenéicas del donador, pero retienen una reactividad inmune normal contra las células de terceros.

Por lo tanto, la presente invención contempla además un método para acondicionar a un paciente al que se va a trasplantar con células del donador, o con un tejido u órgano. El método comprende los pasos de:

(a) reducir los niveles de células que llevan CD3 viables

(es decir, células T) en el paciente (es decir, en la sangre periférica o en el sistema linfático del paciente);

(b) proporcionar un inóculo que comprenda células hematopoyéticas aisladas (es decir, médula ósea y/o células sanguíneas periféricas enriquecidas con células de tallo) del donador tratado con una cantidad de inmunotoxina efectiva para agotar las células T;

(c) introducir el inóculo en el paciente; y después, trasplantar las células, el tejido, o el órgano del donador al paciente.

El método anterior de preferencia se lleva a cabo en ausencia de irradiación de cuerpo total o de irradiación linfoide total, y más preferiblemente, en ausencia de radiación.

6. Composiciones que Comprenden la Inmunotoxina

El polipéptido de inmunotoxina recombinante de la invención se puede administrar como un polipéptido no modificado, o su sal farmacéuticamente aceptable, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se utiliza en la presente, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a las sales preparadas a partir de ácidos no tóxicos farmacéuticamente aceptables, para formar sales de adición de ácido de un grupo amino de la

82

cadena de polipéptido, o a partir de bases no tóxicos farmacéuticamente aceptables para formar sales básicas de un grupo carboxilo de la cadena del polipéptido. Estas sales se pueden formar como sales internas y/o como sales del término amino o ácido carboxílico del polipéptido de la invención. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables adecuadas son aquellas de ácidos orgánicos, ácidos poliméricos, o ácidos inorgánicos no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de los ácidos orgánicos adecuados comprenden ácidos acético, ascórbico, benzoico, bencensulfónico, cítrico, etansulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, y cetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metansulfónico, múcico, nítrico, oxálico, pamoico, pantoténico, fosfórico, salicílico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluensulfónico, etcétera, así como ácidos poliméricos, tales como ácido tánico o carboximetilcelulosa. Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos minerales, tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, y similares. Los ejemplos de las bases inorgánicas adecuadas para formar sales de un grupo carboxilo incluyen las sales de metal alcalino, tales como las sales de sodio, potasio, y litio; las sales alcalinotérreas, tales como, por ejemplo, las sales de calcio, bario, y magnesio; y las sales de amonio, cobre, ferrosas, férricas, de zinc, manganosas, de aluminio, mangánicas, y similares. Se prefieren las sales de amonio,

calcio, magnesio, potasio, y sodio. Los ejemplos de las bases orgánicas farmacéuticamente aceptables adecuadas para formar sales de un grupo carboxilo incluyen aminas orgánicas, tales como, por ejemplo, trimetilamina, trietilamina, tri(N-propil)amina, diciclohexilamina, ß-(dimetilamino)-etanol, tris(hidroximetil)aminometano, trietanolamina, ß-(dietilamino)-etanol, arginina, lisina, histidina, N-etilpiperidina, hidrabamina, colina, betaina, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazinas, piperidinas, cafeína, procaína, y similares.

Las sales de adición de ácido de los polipéptidos se pueden preparar de la manera usual, poniendo en contacto el polipéptido con uno o más equivalentes del ácido inorgánico u orgánico deseado, tal como, por ejemplo, ácido clorhídrico. Las sales de los grupos carboxilo del péptido se pueden preparar convencionalmente poniendo en contacto el péptido con uno o más equivalentes de una base deseada, tal como, por ejemplo, una base de hidróxido metálico, por ejemplo hidróxido de sodio; una base de carbonato o bicarbonato de metal, tal como, por ejemplo, carbonato de sodio o bicarbonato de sodio; o una base de amina, tal como, por ejemplo, trietilamina, trietanolamina, y similares.

Para las aplicaciones <u>in vivo</u> o <u>ex vivo</u>, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden un vehículo que de preferencia es un líquido estéril, excento de

84

pirógeno, parenteralmente aceptable. Los vehículos líquidos preferidos son agua, suero fisiológico, dextrosa acuosa, y glicoles, particularmente (cuando son isotónicas) para soluciones inyectables, o para usos ex vivo.

Las composiciones que comprenden la inmunotoxina o su sal, se pueden administrar sistémicamente, es decir, parenteralmente (por ejemplo, intramuscularmente, intravenosamente, subcutáneamente, o intradérmicamente), o mediante administración intraperitoneal.

Las composiciones particularmente útiles para administración parenteral, tal como administración intravenosa o administración en una cavidad del cuerpo o lumen de un órgano, comúnmente comprenderán una solución de la proteína de fusión disuelta en un vehículo farmacéuticamente aceptable, de preferencia en un vehículo acuoso, tal como suero regulado o similar. Estas composiciones son estériles y generalmente están libres de materia indeseable. Estas composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las composiciones también pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, como se requieran para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y regulación del pH, agentes de ajuste de toxicidad, y similares, por ejemplo acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio, y similares. La concentración de la proteína

de inmunotoxina en estas formulaciones puede variar ampliamente, y se seleccionará basándose primariamente en los volúmenes de fluido, las viscosidades, el peso del cuerpo, y similares, de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado y las necesidades del paciente. Los métodos reales para la preparación de composiciones parenteralmente administrables serán conocidos o aparentes para los expertos en la materia, y se describen con mayor detalle en Publicaciones tales como Remington's Pharmaceuticals Science, 15ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980).

Las composiciones farmacéuticas que comprenden las inmunotoxinas y sus sales, también se pueden utilizar para administración oral, tópica, o local, tal como mediante aerosol o transdérmicamente.

Las formas de dosificación unitaria adecuadas para administración oral incluyen polvo, tabletas, píldoras, cápsulas, y grageas. Se reconoce que los polipéptidos, cuando se administran oralmente, deben protegerse de la digestión, tal como mediante la formación del complejo de la proteína con una composición para hacerla resistente a la hidrólisis ácida y enzimática, o mediante el empaque de la proteína en un vehículo apropiadamente resistente, tal como un liposoma. En la materia se conocen diferentes medios para proteger a las proteínas de la digestión.

Los ejemplos de la forma de dosificación tópica

incluyen rocíos, soluciones oftálmicas, soluciones nasales, y ungüentos. Por ejemplo, un rocío se puede fabricar disolviendo el péptido en un solvente apropiado, y poniéndolo en un rociador para servir como un aerosol para la terapia por inhalación comúnmente empleada. Una solución oftálmica o nasal se puede fabricar disolviendo el péptido de ingrediente activo en agua destilada, agregando cualquier agente auxiliar requerido, tal como un regulador, un agente isotonizante, un espesante, conservador, estabilizante, tensoactivo, antiséptico, etcétera, y ajustando la mezcla a un pH de 4 a 9. También se pueden preparar ungüentos, por ejemplo, mediante la preparación de una composición a partir de una solución polimérica, tal como un polímero de carboxivinilo acuoso al 2 por ciento, y una base, tal como hidróxido de sodio al 2 por ciento, mezclando para obtener un gel, y mezclando con el gel una cantidad de polipéptido de fusión purificado.

La composición puede ser un liofilizado preparado mediante métodos bien conocidos en este campo.

En la práctica de los métodos en vivo de la presente invención, se administra una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de inmunotoxina recombinante, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica que lo contenga, como se describe anteriormente, a un paciente que lo necesite.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención

87

también proporciona:

1. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante que comprende un dominio de enlace de CD3, por ejemplo un dominio de enlace de CD3 que comprende un anticuerpo anti-CD3 humano, por ejemplo un fragmento Fab de un anticuerpo anti-CD3 humano, y un mutante de exotoxina de *Pseudomonas* (PE), teniendo este mutante de PE funciones de ribosilación de ADP y de translocación, pero una capacidad de enlace celular sustancialmente disminuida.

2. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1, en donde el dominio de enlace de CD3 comprende la región Fv, o un fragmento de enlace de CD3 de la misma, de un anticuerpo anti-CD3 humano, por ejemplo un anticuerpo anti-CD3 humano que se enlaza con un epítopo sobre la cadena e del CD3 humano, o un epítopo formado por las cadenas ε y γ del CD3 humano.

3. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1,en donde el dominio de enlace de CD3 comprende el anticuerpo UCHT-1 o la región Fv, o un fragmento de enlace de CD3 del mismo, del anticuerpo UCHT-1 o de su homólogo, o un Fv de una sola cadena (o fragmento de enlace de CD3 del mismo), por ejemplo de UCHT-1 u homólogo.

4. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante que comprende un dominio de enlace de CD3 que consiste esencialmente en la región Fv de una sola cadena del anticuerpo UCHT-1 fusionada con un mutante de exotoxina de *Pseudomonas*

esencialmente agotado de su dominio de enlace celular, por ejemplo mutante de exotoxina de *Pseudomonas* PE38.

5. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante que tiene la SEQ ID NO:2, y sus sales farmacéuticamente aceptables, y homólogos de los mismos.

6. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante que tiene los residuos 2-601 de la SEQ ID NO:2, y sus sales farmacéuticamente aceptables, o los residuos 3-601 de la SEQ ID NO:2 y sus sales farmacéuticamente aceptables.

7. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1.

8. Un método para preparar un pólipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1.

9. Un método para el tratamiento o la profilaxis de desórdenes mediados por células T en un paciente, el cual comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad efectiva agotadora de células T de un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1.

10. Un método para el tratamiento o la profilaxis de rechazo de trasplante de órgano en un paciente de trasplante, el cual comprende administrar al paciente una cantidad efectiva agotadora de células T de un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1.

11. Un método para el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad autoinmune en un paciente, el cual comprende

administrar al paciente una cantidad efectiva agotadora de células T de un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1.

12. Una terapia autóloga para tratar o prevenir un desorden o condición mediada por células T en un paciente, la cual comprende:

(a) reclutar del paciente una población celular que comprenda células que lleven CD3;

(b) tratar la población celular con un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1, para agotar cuando menos parcialmente la población celular de células que llevan CD3; y

(c) reinfundir la población celular tratada en el paciente.

13. Un método para el tratamiento o la profilaxis contra la enfermedad del injerto contra el huésped en un paciente que se va a someter a un trasplante de médula ósea, el cual comprende:

(a) proporcionar un inóculo que comprenda médula ósea aislada y/o células sanguíneas periféricas enriquecidas con células de tallo de un donador adecuado tratado con una cantidad efectiva agotadora de células T de un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1; y

(b) trasplantar el inóculo en el paciente.

14. Un método para el tratamiento o la profilaxis, o el tratamiento de rechazo de trasplante en un paciente que se va a

someter a un trasplante de médula ósea, el cual comprende:

(a') reducir los niveles de la población de células que llevan CD3 viables en el paciente;

(b') proporcionar un inóculo que comprenda médula ósea aislada y/o células sanguíneas periféricas enriquecidas con células de tallo de un donador adecuado tratado con una cantidad efectiva agotadora de células T de un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1; y

(c') introducir el inóculo en el paciente, y después administrar opcionalmente un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1 al paciente, para agotar adicionalmente las células T del donador y del paciente.

15. Un método para acondicionar a un paciente que se va a trasplantar con células, o un tejido u órgano de un donador, comprendiendo el método:

(a") agotar la población de células que llevan CD3 en el paciente;

(b") proporcionar un inóculo que comprenda médula ósea aislada y/o células sanguíneas periféricas enriquecidas con células de tallo del donador tratado con una cantidad efectiva agotadora de células T de un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1;

(c") introducir el inóculo en el paciente; y

(d") trasplantar las células, tejido, u órgano del donador al paciente.

16. Un método como en 15, el cual comprende la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1 a 6, y un derivado o análogo de espergualina.

17. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1 a 6, para utilizarse en la fabricación de un medicamento para utilizarse en cualquiera de los métodos como en 9 a 16.

18. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1 a 6, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo.

19. Una composición farmacéutica para utilizarse en cualquiera de los métodos como en 9 a 16, la cual comprende un polipéptido de inmunotoxina recombinante como en 1 a 6, junto con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables para el mismo.

La siguiente ejemplificación se presenta para ilustrar la presente invención, y para proporcionar asistencia a un experto ordinario en la fabricación y uso de la misma, y no pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1 Preparación de scFv(UCHT-1)-PE38

(a) Clonación de regiones variables del anticuerpo UCHT-1 a partir de células de hibridoma

92

Los genes que codifican la región Fv de CD3 murino anti-humano, se amplifican mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, a partir de ARN de hibridoma de UCHT-1 (Beverley y Callard, 1981), utilizando cebadores de oligonucleótido basados en la secuencia publicada del scFv de UCHT-1 (Shalaby y colaboradores, supra), y sobre los cebadores en consenso descritos para la clonación de regiones variables de anticuerpo [Orlandi y colaboradores, PNAS 86:3833-3387(1989)], es decir, SEQ ID NO:1 a SEQ ID NO:22.

Se utilizan los oligonicleótidos IM34A e IM34B para amplificar la región V_L, y se utilizan IM-61 e IM-34C para amplificar el fragmento V_H. Los dos fragmentos amplificados se subclonan entonces en vectores de plásmido de *E. coli* (Vector TA, Invitrogen), y se determinan sus secuencias de ADN.

Después de determinar las secuencias de ADN clonadas, las dos moléculas se combinan en un solo plásmido basado en pUC18, cortando el pUC18, y los fragmentos de la reacción en cadena de la polimerasa se subclonan en los sitios de restricción apropiados, y se ligan junto con la ligasa de ADN T4. Este plásmido, que contiene V_L, seguido por un polienlazador que a su vez es seguido por V_H, se corta con XbaI más SalI. Un enlazador comprendido de los dos oligonucleótidos templados, IM-24A a IM-24B, diseñado para contener los extremos complementarios para estos dos sitios, se inserta entre los sitios XbaI y SalI. El clon resultante, 'Clon B', codifica una

inmunotoxina de una sola cadena con un enlazador diferente de aquel descrito en la SEQ ID NO:2. El reemplazo de este enlazador con el enlazador $(GGGS)_4$ (SEQ ID NO:5) utilizado en scFv(UCHT-1)PE38 se describe más adelante. Sin embargo, primero fue necesario investigar dos cambios en las secuencias de región variable, que se observaron en relación con la secuencia del fragmento del clon Fv reportado en Shalaby y colaboradores, supra:

(1) un cambio de A a C en la posición del nucleótido 208 en la secuencia de la cadena pesada (V_H). Esto es posible que refleje un error por Shalaby y colaboradores, supra, debido a que como se reportó, el aminoácido (Leu) codificado en esta posición, no se correlaciona con la secuencia de nucleótidos del documento, sino que se correlaciona con la secuencia del clon actualmente obtenido; y

(2) un cambio de Phe a Ser en el residuo de aminoácido 98. Este parece ser un error inducido por la reacción en cadena de la polimerasa, y esta mutación de punto en V_L se corrige utilizando una reacción en cadena de la polimerasa de cuatro vías estándar, en donde se incorpora el cambio de nucleótido deseado utilizando los oligonucleótidos complementarios VL2 y VL3. Los oligonucleótidos de flanqueo, VL1 sobre el lado 5', y VH4 sobre el lado 3', estabilizan el cambio, como se describe en seguida.

a1. Corrección de la mutación de punto en VL.

Se establecen reacciones en cadena de la polimerasa utilizando el 'Clon B' de pUC18/UCHT-1 como plantilla, con los pares de oligonucleótidos VL1 y VL2, o VL3 y VH4. Los dos productos distintos de la reacción en cadena de la polimerasa se separan mediante electroforesis en gel, se templan sus extremos complementarios, y se realiza una segunda reacción en cadena de la polimerasa, en donde se utilizan VL1 y VH4 para unir estos dos fragmentos, utilizando los productos previamente templados como plantilla.

a2. Reemplazo del enlazador del 'Clon B'.

El enlazador que separa V_L y V_H se cambia a un enlazador que contiene la secuencia $(Gly_3Ser)_4$ (SEQ ID NO:5), por dos reacciones en cadena de la polimerasa en secuencia, utilizando el plásmido con la mutación de punto corregida como plantilla. El cebador 5' para ambas reacciones en secuencia es complementario para las secuencias del vector (M13R; New England Biolabs). El cebador 3' para la primera reacción en cadena de la polimerasa es VL6, y el cebador 3' para la segunda reacción es VL8. VL6 y VL8 son complementarios para la cadena de codificación; el sitio BstXI en VL8 se presenta hacia el término N del fragmento V_H de UCHT-1. El producto de la reacción en cadena de la polimerasa resultante de esta segunda reacción en cadena de la polimerasa codifica el extremo COOH-

terminal de V_L, el nuevo enlazador, y el término N de V_H (justamente más allá del sitio BSTXI).

El producto de la reacción en cadena de la polimerasa a partir de esta segunda reacción en cadena de la polimerasa se extiende adicionalmente en una tercera reacción en cadena de la polimerasa para agregar la región N-terminal de V_L. Esta reacción utiliza el segundo producto de la reacción en cadena de la polimerasa como el cebador 3', y el cebador ME13R (New England Biolabs) dentro del vector como el cebador 5'. La plantilla para esta tercera reacción en cadena de la polimerasa es el plásmido del 'Clon B' de pUC18/UCHT-1. Para sustituir el segundo enlazador por el primero, y para unir el producto de la reacción en cadena de la polimerasa con el resto de V_H, el producto de la reacción en cadena de la polimerasa de esta tercera reacción se corta con BamHI, lo cual se presenta en la unión de V_L y el vector, y con BstXI que se presenta dentro de V_H. El plásmido del 'Clon B' de pUC18/UCHT-1 también se corta con BamHI y BstXI; el área correspondiente se sustituye con el nuevo producto.

Los cebadores y oligonucleótidos utilizados en el Ejemplo 1, son aquellos de las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 (oligonucleótido de codificación utilizado para la clonación), SEQ ID NO:15 (oligonucleótido de codificación para el enlazador), SEQ ID NO:16 (oligonucleótido no codificador

correspondiente para el enlazador), SEQ ID NO:17 (extremo 5' de VL en los nucleótidos 102-124), SEQ ID NO:18 (cebador 3' con el T correcto en el nucleótido #293), SEQ ID NO:19 (cebador 5' con el T correcto en el nucleótido 293), SEQ ID NO:20 (cebador no codificador), SEQ ID NO:21, y SEQ ID NO:22.

(b) Clonación de PE38

La clonación de PE38 es descrita por Benhar y colaboradores [Bioconjugate Chem. 5:No.4 (1994)], y también en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números US 5,981,726 y US 5,990,296, incorporadas como referencia.

(c) Preparación de la fusión de la inmunotoxina

El nuevo scFv se clona en el vector de expresión en *E. coli*, Pet15B (Novagen). Primero se agregan los sitios al scFv utilizando reacción en cadena de la polimerasa, para hacer a este fragmento compatible con el vector de clonación pET15b y con el sitio HindIII a partir del plásmido que contiene la exotoxina P., pRB391 (regalo de I. Pastan). De una manera alternativa, la secuencia de ADN que codifica el fragmento PE38 se puede reconstruir a partir del plásmido pJH8, que está depositado en la ATCC, como ATCC 67208, utilizando métodos estándares de reacción en cadena de la polimerasa, y cebadores de oligonucleótido apropiados. En este método, el plásmido pJH8 requeriría de mutagénesis mediante reacción en cadena de la

polimerasa, para agregar el sitio HindIII y la secuencia conectora presente en el plásmido pRB391, y como se describe en Benhar y colaboradores, 1994, supra. En adición, la remoción de los 16 aminoácidos (365-380 de la PE nativa) del dominio Ib interno al fragmento PE40, se puede realizar mediante reacción en cadena de la polimerasa, dando como resultado un plásmido que es funcionalmente idéntico al fragmento PE38 de pRB391. La confirmación de que el plásmido resultante está en el mismo marco de traducción se puede obtener mediante análisis de secuencia del ADN).

Los residuos amino-terminales Met y Ala, codificados por un sitio de restricción NcoI, se agregan para facilitar la expresión a partir del plásmido.

La secuencia de aminoácidos del producto (que contiene Met-Ala en el término N) se da en la SEQ ID NO:2, y la secuencia de nucleótidos correspondiente en la SEQ ID NO:1.

En la SEQ ID NO:2, V_L comprende los residuos 3-111, el enlazador de péptido ocupa los residuos 112-127, V_H comprende los residuos 128-249, el conector, se localiza en los residuos 250-254, y la PE truncada comprende los residuos 255-601. Los residuos amino-terminales Met y Ala son codificados por el sitio de restricción NcoI (secuencia de ADN desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 6) agregado para facilitar la expresión a partir del plásmido pET 15b de *E. coli*. El ADN no codificador 3' entre el sitio EcoRI (secuencia de ADN desde el nucleótido

1901 hasta el nucleótido 1906), y el sitio BgII/BamHI (secuencia de ADN desde el nucleótido 1939 hasta el nucleótido 1944)se lleva delante de la secuencia desde el polienlazador de un vector de clonación intermedio (pLitmus 38, New England Biolabs). Hay un sitio de restricción HindIII en la secuencia de ADN desde el nucleótido 751 hasta el nucleótido 756.

La expresión de scFv(UCHT-1)-PE38 en la cepa BLR(DE3) de *E. coli* se encuentra que produce un producto altamente homogéneo (es decir, pureza del 95 o mayor), que comprende el polipéptido guiado por alanina, que tiene los residuos 2-601 de la SEQ ID NO:2.

(d) Fermentación, repliegue, y purificación de scFv(UCHT-1)-PE38

Se establece un proceso para la producción de scFv(UCHT-1)-PE38 recombinante en la escala 50L. El pET 15b se transforma en BLR(DE3) de *E. coli* (Novagen, Inc.,). Se emplea un sistema de alimentación por lotes utilizando una estrategia de alimentación de pH-stat-glicerol auto-reguladora. La alimentación empieza exactamente después de que se agota la cantidad inicial de fuente de carbono, y automáticamente se alimenta glicerol de una manera limitada, controlada por el pH. Este procedimiento elimina el efecto perjudicial de un exceso de glicerol, y también de un agotamiento completo de la fuente de carbono.

El medio óptimo contiene: 6 gramos/litro de KH_2PO_4, 0.6 gramos/litro de KCl, 0.2 gramos/litro de $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 24.0 gramos/litro de N-Z-amina A, 72 gramos/litro de extracto de levadura, 100 miligramos/litro de Fe(III)-citrato de amonio, 12 miligramos/litro de $MnSO_4 \cdot H_2O$, y 10 gramos/litro de glicerol. Para niveles de expresión óptimos, se necesita una inducción de impulso de lactosa en OD_{550} de 50. Utilizando este planteamiento, se cosechan 4.3 kilogramos de gránulo celular húmedo que contiene 1 kilogramo de cuerpos de inclusión después de 24 horas desde la prueba del experimento de fermentación bajo las condiciones siguientes: volumen: 50 litros; mezcla: 200-250 rpm; aireación/presión: 1 vvm/1 bar; control de pO_2: ajuste manual; control del pH: $6.7 < x < 7.1$; alcalino: NaOH 2N; temperatura: 37°C; inóculo: 1.0 litros de precultivo crecido en LB hasta una OD_{550} =1.0; inducción: 50 gramos/litro de D-lactosa hasta una OD_{550} = 52; cosecha: 11 horas después de la inducción.

Se alcanzan niveles de expresión del 25 por ciento de la proteína celular total después de la inducción con un exceso de D-lactosa a una OD_{550} de 50, como es evaluado mediante densitometría de geles SDS-PAGE. Utilizando este planteamiento, se mide una productividad de 86 gramos de gránulo celular húmedo (wcp) y 20 gramos de cuerpos de inclusión (Ibs) por litro de caldo fermentador. Se determina una titulación del producto de 1.4 gramos/litro mediante SDS-PAGE y cuantificación

densitométrica de scFv(UCHT-1)-PE38.

Luego se extrae la proteína de fusión scFv(UCHT-1)-PE38, y se repliega de acuerdo con el método general de Buchner y colaboradores, supra, modificado como sigue:

(1) los gránulos bacterianos congelados (65 gramos), que contienen scFv(UCHT-1)-PE38 inducido en la forma de cuerpos de inclusión, se descongelan a la temperatura ambiente, y subsecuentemente se transfieren a frascos de 250 mililitros. Se agregan 180 mililitros de TES (Tris-HCl 50 mM, pH de 7.4, EDTA 20 mM, y NaCl 100 mM en agua) a los frascos, y los gránulos se suspenden completamente utilizando un alterador de tejido Polytron. Se distribuyen porciones de las células suspendidas (30 mililitros) en frascos frescos de 250 mililitros, y se diluyen hasta 180 mililitros por frasco con TES. Se agregan 8 mililitros de solución de lisozima (8 miligramos/mililitro en TES) a cada frasco, se vuelven a suspender los gránulos, y se incuban las suspensiones a la temperatura ambiente durante 1 hora.

(2) Se agregan 20 mililitros de Triton-X100 al 25 por ciento a cada frasco, y las mezclas se agitan bien. Las mezclas se incuban a la temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego se centrifugan los lisados celulares a 13,000 rpm durante 50minutos utilizando un rotor GSA.

(3) Los gránulos se vuelven a suspender en 180 mililitros de TE (Tris-HCl 50 mM, pH de 7.4, y EDTA 20 mM). Las

suspensiones se homogeneizan utilizando un alterador de tejido Polytron durante 2 minutos. Se agregan 20 mililitros de Triton-X100 al 25 por ciento a cada frasco, y las mezclas se agitan bien. Las mezclas se centrifugan a 13,000 rpm durante 10 minutos.

(4) Se repiten los pasos de lavado con detergente (Triton-X100) descritos en (b) tres veces para producir cuerpos de inclusión relativamente puros. Los cuerpos de inclusión se vuelven a suspender en 180 mililitros de TE, y luego se centrifugan a 13,000 rpm durante 10 minutos.

(5) Se repiten los pasos de enjuague con TE descritos en (3) tres veces. Los cuerpos de inclusión se agrupan y se congelan como gránulos a -70°C.

(6) Se agregan 42 mililitros de regulador de solubilización que contiene guanidina-HCl 6M (peso molecular = 95.53) con Tris-HCl 0.1M, pH de 8.0, y EDTA 2 mM, a los cuerpos de inclusión agrupados. Los cuerpos de inclusión se suspenden mediante pipeta. La suspensión se transfiere a dos tubos de centrifugación de 50 mililitros. Los contenidos se incuban a la temperatura durante la noche, y se centrifugan.

(7) Los lotes de 100 miligramos de proteína de cuerpo de inclusión desnaturalizada se procesan mediante reducción y renaturalización. Se agrega DTE hasta 0.3M, y la mezcla se incuba a la temperatura ambiente durante 2 horas antes de la adición rápida de esta muestra (100 miligramos de proteína de

cuerpo de inclusión desnaturalizada) a 100 volúmenes de regulador de repliegue. El regulador de repliegue se prepara combinando Tris 0.1 M, p de 8.0, L-arginina-HCl 0.5 M (FW 210.7 g), y EDTA 2 mM, ajustado a un pH de 9.5 con NaOH 10N, y se equilibra hasta 8-10°C antes de la adición de la glutationa oxidada (GSSG, MW 612.6 g) hasta 8 mM. La muestra se deja replegar a 10°C durante 30 a 40 horas sin agitación. La muestra se concentra en un biocentrador, y se dializa en Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, EDTA 1 mM, y urea 100 mM.

(8) La inmunotoxina replegada se purifica mediante dos rondas en secuencia de cromatografía de intercambio de aniones, la primera utilizando Fast-Flow Q (Pharmacia), con una elución en gradiente por pasos de sal, y la segunda utilizando una columna Q5 (BioRad), seguida por una elución en gradiente de sal. Se utilizan los siguientes reguladores durante la cromatografía en columna para las eluciones en gradiente por pasos y lineal:

equilibrio:	Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, EDTA 1 mM
lavado:	Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 0.8 M
elución:	Tris-HCl 20 mM, pH de 7.4, EDTA 1 mM, NaCl 0.8 M

Entonces se diluye el pico eluido cinco veces con regulador de equilibrio, y se aplica a la columna Q5 en el siguiente paso de purificación.

Se recupera un solo pico de la segunda columna de

intercambio de aniones. Este pico se correlaciona con scFv(UCHT-1)-PE38 (> 95 por ciento puro), como es evidenciado por la movilidad en la posición esperada (64.5 kD), en seguida de SDS-PAGE, y mediante reacción cruzada sobre manchas Western sondeadas con anticuerpos policlonales de conejo anti-PE38.

El rendimiento de scFv(OCHT-1)-PE38 correctamente replegado recuperado utilizando el procedimiento anterior, alcanzó 50 miligramos/litro utilizando las concentraciones anteriormente indicadas de DTE y GSSG.

Se reproduce el protocolo de repliegue en 16 lotes de material, que se repliegan para producir el material con valores IC_{50} muy similares, como se determina en el ensayo de MTS (Tabla I).

Los primeros once lotes producen una proteína que tiene una mutación de punto que convierte la serina a arginina en el residuo 63 en la tercera región de estructura de la cadena ligera variable de UCHT-1.

Basándose en los resultados in vitro presentados en la Tabla I, esta mutación parece tener poca o ninguna consecuencia en términos de la citotoxicidad específica in vitro.

Cinco lotes de proteína (es decir, los lotes 12, 13, 14, 15, y 16"), en donde se corrige la mutación de punto, se repliegan.

Debido a la alta reproducibilidad en el ensayo MTS, se agrupan los lotes 12 y 13, y los lotes 14, 15, y 16. Los lotes

agrupados se prueban para determinar la potencia en este ensayo MTS (ver la Tabla I), y luego se combinan ellos mismos para formar los "Lotes Agrupados 12-16", utilizados en la mayoría de los estudios in vitro y en los estudios in vivo, reportados en la presente. Los Lotes Agrupados 10a-12a, que también comprenden el material corregido, se obtienen de una manera similar, y se prueba (Tabla I). El análisis mediante PAGE no desnaturalizante revela que existe scFv(UCHT-1)-PE38 purificado en solución como un monómero. En adición, parece no haber material agregado, como se ensayó mediante cromatografía en columna con exclusión de tamaños (Sephacryl S200), o mediante dispersión de luz dinámica. Esencialmente toda la proteína emigra cerca de la posición de la albúmina de suero bovino (66 kD).

La utilidad de un polipéptido de inmunotoxina recombinante de la invención, en el tratamiento y profilaxis de rechazo de trasplante de órgano y de la enfermedad del injerto contra el huésped, y para la inducción de tolerancia inmunológica, así como para el tratamiento o profilaxis de enfermedades autoinmunes, SIDA, y otros desórdenes inmunológicos mediados por células T, y leucemias o linfomas de células T, como se especifican anteriormente en la presente, se puede demostrar, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos posteriormente en la presente, así como en la clínica.

Actividad Biológica de las Inmunotoxinas

(1) Ensayo MTS de scFv(UCHT-1)-PE38

Se demuestra la toxicidad específica hacia una línea de células T Jurkat humana que expresa $CD3^+$, utilizando un ensayo MTS 3 días después de la adición de inmunotoxina a las células.

En el ensayo MTS, se mide la viabilidad celular agregando MTS, es decir (3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2H-tetrazolio, sal interna), que se metaboliza mediante las células viables en la presencia del agente de acoplamiento de electrones, metosulfato de fenacina, hasta un derivado de formazano soluble en agua. La absorbencia a 490 nanómetros del derivado de formazano es proporcional al número de células viables. El número de células viables en el momento de la adición del compuesto de prueba se compara con el número de células viables presentes a las 72 horas después de la adición del compuesto. El control negativo para la toxicidad no específica es la línea de células B humana ramos $CD3^-$.

La inmunotoxina scFv(UCHT-1)-PE38 es muy potente (aproximadamente 10 pM), medida por la aniquilación de células $CD3^+$ en el ensayo MTS. En altas concentraciones, la proteína reduce el número de células viables debajo del número de células iniciales, y por consiguiente, se comporta como un agente citotóxico.

(2) Estabilidad térmica de scFv

Se mide la estabilidad térmica de scFv(UCHT-1)-PE38

utilizando el ensayo MTS descrito anteriormente. Las muestras se incuban a 4°C, a 25°C, y a 37°C, a 100 microgramos/mililitro, en suero regulado con fosfato. El material es completamente estable a 4°C y a 25°C durante un mes. A 37°C, puede haber un ligero incremento en la IC_{50} a los 21 o a los 28 días.

(3) Ensayo de inhibición de la síntesis de proteína para scFv(UCHT-1)-PE38

Las células se incuban durante la noche en la presencia o en ausencia de la inmunotoxina. A la siguiente mañana, las células se impulsan durante 3 horas con ^{3}H-leucina. Las placas se congelan a -80°C para la lisis celular, y luego se cosechan sobre una estera de fibra de vidrio de filtro utilizando un cosechador de células y extensos lavados con agua. La incorporación en la proteína se mide utilizando un lector Wallac Betaplate. Normalmente, en la ausencia de la inmunotoxina, la incorporación de ^{3}H-leucina es de 3,000 a 4,000 cpm; el fondo de la etiqueta agregado inmediatamente antes del procesamiento de las células, es de 400-700 cpm. La desviación estándar de las cavidades triplicadas dentro de una placa es generalmente del <10 por ciento, y la variación de la incorporación promedio entre las placas es del <10 por ciento.

Inhibición de la síntesis de proteína en células Jurkat ($CD3^+$) y Ramos ($CD3^-$); IC_{50} del scFvUCHT-1)-PE38 en este ensayo

es de 6.7 ± 1.9 nanogramos/mililitro, o de 104 ± 29 pM.

La selectividad para la aniquilación está presente inclusive en la más alta concentración probada (100 microgramos/mililitro). En las concentraciones más altas, el número de células se reduce debajo del número de células inicial.

Selectividad de toxicicidad para la línea celular Jurkat $CD3^+$: la IC_{50} para aniquilar las células Ramos $CD3^-$ no se obtiene en estos experimentos, inclusive con una concentración de 4 ó 5 registros más alta de scFv(UCHT-1)-PE38.

(4) Reacción de linfocitos mixta (MLR) de sangre humana

La capacidad de la inmunotoxina scFv(UCHT-1)-PE38 para prevenir la proliferación de las células mononucleares sanguíneas periféricas humanas alorreactivas (PBMC) se mide utilizando una reacción de linfocitos mixta (MLR) de dos días. La MLR es una medida del aloestímulo. La interferencia con la proliferación celular en el ensayo MLR es una medida de la potencia de un agente inmunosupresor para actuar sobre las células sanguíneas humanas intactas.

La MLR humana se realiza de acuerdo con los procedimientos convencionales. Se aíslan células mononucleares sanguíneas periféricas de tres donadores diferentes (A, B, C) sobre Ficoll, a partir de capas esponjosas con un tipo desconocido de antígenos de leucocitos humanos

(Kantonspital/Basel/Blutspendezentrum). Las células se mantienen a 2 x 10^7 células/1 mililitro (suero fetal de becerro al 90 por ciento, sulfóxido de dimetilo al 10 por ciento) en criotubos (Nunc) en nitrógeno líquido hasta utilizarse. Para iniciar la MLR, las células se descongelan, se lavan, y se cuentan.

En cada uno de dos experimentos ("A" y "B"), se establecen tres reacciones individuales de dos vías (A<->B, A<->C, B<->C) mezclando las células de dos donadores diferentes en una proporción de 1:1 por número de células. Las células mixtas (total de 4 x 10^5 células/0.2 mililitros) se co-cultivan por triplicado durante 6 días a 37°C, CO_2 al 5 por ciento. La ciclosporina A sirve como un control positivo. Los cultivos se realizan en la presencia de concentraciones crecientes de inmunotoxina (Lotes Agrupados 12-16) o control. La proliferación se determina por la recuperación de ^{3}H-TdR (1 mCi/0.2 ml) durante las últimas 16 horas del cultivo.

Se determina que la potencia de scFv(UCHT-1)-PE38 para prevenir la proliferación de células mononucleares sanguíneas periféricas de sangre humana en una reacción de linfocitos mixta (MLR) <u>in vitro</u> en los dos experimentos anteriores, es de 0.11 $\pm$ 0.053 nanogramos/mililitro, y de 0.035 $\pm$ 0.002 nanogramos/mililitro, dando como resultado una IC global de 0.072 $\pm$ 0.053 nanogramos/mililitro (1.12 pM). Los datos demuestran que la scFv(UCHT-1)-PE38 suprime eficientemente la

consiguiente, los hermanos son genéticamente diferentes. Los ratones transgénicos homocigóticos para CD3ε humano se reproducen con los ratones de tipo silvestre C57BL/6 para generar los ratones heterocigóticos. Los animales se mantienen como homocigotos para el transgen, y se utilizan como heterocigotos después de la retrocruza con C57BL/6. Los animales heterocigóticos para la inserción de tge600 se utilizan para la prueba de sensibilidad in vitro a scFv(UCHT-1)-PE38, y agotamientos in vivo ocasionado por scFv(UCHT-1)-PE38 después de la administración intravenosa o intraperitoneal. Se utiliza el Lote Agrupado 12-16 para estos experimentos. Para el trabajo in vitro, se utiliza la progenie F1 de una cruza CBA x C57BL/6 como animales de control. En los experimentos in vivo, los ratones tge600 heterocigóticos no tratados sirven como un grupo de control.

La capacidad de scFv(UCHT-1)-PE38 para inhibir la proliferación in vitro de los esplenocitos a partir de ratones transgénicos que expresan CD3ε humano, se evalúa mediante la proliferación inducida por Concanavalina A, así como una reacción de linfocitos mixta de una vía.

Los bazos se alteran, se pasan a través de un filtro de nylon (0.45 micras), y se pasan suavemente por pipeta con una jeringa de 1 mililitro para generar una sola suspensión celular. Los glóbulos rojos de la sangre se lisan utilizando regulador ACK (cloruro de amonio 0.15 M, carbonato de potasio 1

mM, EDTA 0.1 mM), y la suspensión resultante se lava tres veces en RPMI-1640 complementado con suero fetal de bovino al 5 por ciento. Se agrega concanavalina A a las cavidades a 5 microgramos/mililitro. Las placas se incuban durante 3 días a 37°C en CO_2 al 5 por ciento. En el tercer día, se agrega un µCi/cavidad de ^{3}H-timidina. Después de 24 horas, las células se cosechan sobre filtros de fibra de vidrio, y se mide la incorporación ^{3}H-timidina utilizando un lector de placas Wallac ß.

La adición de scFv(UCHT-1)-PE38 bloquea la proliferación inducida por Concanavalina A (5 microgramos/mililitro) de los esplenocitos transgénicos CD3ε humanos ("HuCD3εTg"), pero no la proliferación de los esplenocitos no transgénicos B6CBAF1 ("No Tg"). La inhibición dependiente de la dosis de las células de los ratones transgénicos se observa con una IC_{50} calculada de 0.6 nanogramos/mililitro. Esto está de acuerdo con la citotoxicidad contra las células Jurkat (0.63 $\pm$ 0.15 nanogramos/mililitro). En altas concentraciones, se observa una inhibición >100 por ciento (es decir, menos proliferación que la observada en ausencia de Concanavalina A), sugiriendo que todos los esplenocitos que responden a la Concanavalina A son sensibles a scFv(UCHT-1)-PE38. La línea marcada con "no ConA" representa la respuesta proliferativa en ausencia de Concanavalina A, debido al medio solamente.

(6) Inhibición de la proliferación de esplenocitos de murino transgénico con CD3ε humano mediante scFv(UCHT-1)-PE38, en la MLR de una vía

Se evalúa la capacidad de scFv(UCHT-1)-PE38 para inhibir la proliferación de células T de esplenocito CD3ε humano in vitro, utilizando una reacción de linfocitos mixta de una vía. En una reacción de linfocitos mixta de una vía, la proliferación se debe al reconocimiento directo del alo-MHC II por parte de los esplenocitos de murino transgénico huCD3ε alo-reactivos. No todas las células T son alo-reactivas, dando como resultado un porcentaje más pequeño de esplenocitos transgénicos que responden, consistente con la señal reducida al ruido del ensayo, y la mayor variabilidad entre los experimentos.

Se preparan esplenocitos transgénicos HuCD3ε ("células CD3Tg") como en la sección 5 anterior. Se utilizan células de bazo de ratones no transgénicos B6CBAF1 ("células No Tg") como un control.

Una sola suspensión celular de esplenocitos Balb/C preparada como en la sección 5 anterior, se trata con mitomicina C (30 microgramos/mililitro) durante 20 minutos a 37°C, y se lava en un medio de MLR.

Las células estimulantes Balb/C tratadas con mitomicina C se agregan a placas de 96 cavidades Corning de cavidades planas a $4x10^5$ células/mililitro. Se agregan los esplenocitos

de los ratones transgénicos a las cavidades a $2x10^5$ células/mililitro, y las placas se incuban durante 3 días a 37°C en CO_2 al 5 por ciento. Al tercer día, se agrega un µCi/cavidad de ^{3}H-timidina. Después de 16 horas, las células se cosechan sobre filtros de fibra de vidrio, y se mide la incorporación de ^{3}H-timidina utilizando un lector de placas Wallac ß.

La inmunotoxina scFv(UCHT-1)-PE38 inhibe la respuesta halogeneica de la MLR en cultivos que contienen esplenocitos Tg huCD3ε, pero no los esplenocitos de control no transgénicos. Se observa la inhibición dependiente de la dosis de las células de los ratones transgénicos, con una IC_{50} calculada de 0.6 nanogramos/mililitro. En altas concentraciones, se observa una inhibición de >100 por ciento, sugiriendo que todas las células T huCD3ε alo-reactivas, son sensibles a scFv(UCHT-1)-PE38. La respuesta de la MLR entre las células de bazo no transgénicas B6CBAF1 y los esplenocitos Balb(C (APC) tratados con mitomicina C, no es inhibida por scFv(UCHT-1)-PE38.

De acuerdo con lo anterior, se encuentra que la inmunotoxina inhibe una respuesta MLR de las células esplénicas transgénicas (células T) huCD3ε estimuladas por células esplénicas BALB/C tratadas con mitomicina C (APC) completamente alogenéicas, de una manera dependiente de la dosis. La potencia de la inmunotoxina en este ensayo es de aproximadamente 0.9 nanogramos/mililitro, es decir, de aproximadamente 14 pM.

(7) Modelo de implante de fibra hueca Jurkat

Se implanten ocho fibras huecas en un solo ratón desnudo: cuatro se colocan intraperitonealmente, y otras 4 se colocan subcutáneamente. Dos de las cuatro fibras huecas en cada lugar contienen células Jurkat $CD3^+$; una de las cuatro fibras en cada lugar contiene células de carcinoma de colon LS174T; y una contiene células de carcinoma de pecho MDA-435S. Seis animales comprenden un grupo.

Se observa que el material utilizado para estos estudios contiene una mutación de punto de T a G en el nucleótido 195 de la SEQ ID NO:2, que cambia la serina (UCHT-1) a arginina (mutante) en el residuo 65 de la SEQ ID NO:2 (es decir, en la tercera región de estructura de la cadena ligera variable). La eficacia de este material en el ensayo MTS de tres días es equivalente a aquella de scFv(UCHT-1)-PE38 sin mutación alguna (Tabla I).

Las células Jurkat crecen en las fibras huecas implantadas en la cavidad peritoneal en ratones desnudos, en seguida de la administración intraperitoneal (150 microlitros en vehículo de suero por ratón) de scFv(UCHT-1)-PE38, en un nivel de dosis de 1 microgramo/ratón, dos veces al día, o 5 microgramos/ratón dos veces al día, a partir de los días 3-6. La fibra se recupera en el día 10.

El crecimiento de células Jurkat es inhibido por aproximadamente el 75 por ciento en las fibras huecas

intraperitonealmente implantadas utilizando 1 microgramo/ratón dosificado intraperitonealmente (dos veces al día durante 4 días), o utilizando 3 microgramos/ratón dosificados intravenosamente (dos veces al día durante 4 días).

Se muestra que la inmunotoxina tiene una eficacia sistémica en vivo para aniquilar una línea de células T humana implantada en ratones desnudos después de la administración intraperitoneal o intravenosa, y la inhibición del crecimiento observada es específica para las células $CD3^+$.

(8) Agotamiento de células T en ratones transgénicos con CD3ε humano

Los ratones heterocigóticos Tge600/C57BL6 descritos anteriormente, se tratan con 4 microgramos/ratón de inmunotoxina (Lotes Agrupados 12-16) dos veces al día durante 4 días. Un día en seguida del tratamiento final, se remueven los nodos linfáticos (LN) y los bazos, y se preparan suspensiones celulares sencillas a partir de los ratones individuales.

El porcentaje de células positivas para CD3 se evalúa mediante análisis FACS de dos colores realizado sobre las suspensiones celulares sencillas, utilizando anticuerpos FITC-anti-huCD3ε (para medir la expresión del CD3ε humano y de los anticuerpos anti-MCD3ε conjugados con ficoeritrina (PE) (500A2-PE) (para medir la expresión de CD3 de ratón). El número de células T en cada órgano se determina multiplicando el número

de células totales recuperadas del órgano por el porcentaje de células positivas para CD3.

El teñido no específico de las células por los anticuerpos de control acoplados con el isotipo es bajo. No se advierte ninguna diferencia en el teñido no específico entre los ratones tratados o no tratados.

Aproximadamente el 20 por ciento de las células totales en el bazo en un animal transgénico no tratado, son positivas tanto para MCD3 como para huCD3. Un pequeño porcentaje de células expresan CD3 de ratón, pero no expresan CD3 humano (3.5 por ciento).

El tratamiento sistémico con scFv(UCHT-1)-PE38 reduce el porcentaje de células que expresan tanto huCD3 como mCD3, de aproximadamente el 20 por ciento al 2 por ciento.

Los resultados de los análisis FACS para los nodos linfáticos (LN) a partir de ratones transgénicos tratados y no tratados, son similares a los resultados que se advierten en el análisis FACS de células de bazo a partir de los ratones transgénicos. Es decir, el teñido no específico de las células por los anticuerpos de control acoplados con el isotipo es bajo. En un ratón transgénico no tratado, aproximadamente el 53 por ciento de las células totales en los nodos linfáticos son positivas tanto para MCD3 como para huCD3. Un pequeño porcentaje de células expresan CD3 de ratón, pero no expresan CD3 humano (2.8 por ciento). Después de la administración

intravenosa de scFv(UCHT-1)-PE38 (4 microgramos/animal) dos veces al día durante 4 días, el porcentaje de células de nodos linfáticos doblemente positivas que expresan huCD3 y MCD3 se reduce desde aproximadamente el 53 por ciento hasta el 12 por ciento.

Los resultados de diferentes regímenes de dosificación del porcentaje y número de células doblemente positivas para CD3 tanto de ratón como humano, son similares tanto para el bazo como para los nodos linfáticos. scFv(UCHT-1)-PE38 ocasiona un agotamiento estadísticamente significativo de las células T doblemente positivas, cuando se administra intravenosamente o intraperitonealmente, en un régimen de dosificación dos veces al día. En adición, se observa un agotamiento dependiente de la dosis en ambos tejidos después de la administración sistémica.

Resumiendo los datos generados, 4 microgramos/ratón intravenosa, ó 5 microgramos/ratón intraperitonealmente, durante 4 días b.i.d., dan como resultado un agotamiento del 86 por ciento y del 95 por ciento en el número de células T de huCD3 esplénicas recuperadas. Se advierte una reducción estadísticamente significativa del número de células del bazo con 0.3 microgramos/ratón intravenosamente b.i.d. durante 4 días, y con 1 microgramo/ratón intravenosamente b.i.d. cuando se considera el porcentaje de células positivas para huCD3. Por consiguiente, la dosis efectiva más baja parece ser de 1 microgramo b.i.d. durante 4 días para el agotamiento esplénico.

Para el nodo linfático, el tratamiento con 4 microgramos/ratón intravenosamente, ó 5 microgramos/ratón intraperitonealmente durante 4 días b.i.d. da como resultado un agotamiento del 97 por ciento y del 92 por ciento en el número de células T de huCD3 recuperadas. Se advierte una reducción estadísticamente significativa del número de células de los nodos linfáticos en los ratones tratados con 3 microgramos/ratón intravenosamente b.i.d. durante 4 días, y con 1 microgramo/ratón intravenosamente b.i.d. durante 4 días, cuando se considera el porcentaje de células positivas para huCD3 en los nodos linfáticos. Por consiguiente, la dosis efectiva más baja parece ser de 1 microgramo b.i.d. durante 4 días para el agotamiento en los nodos linfáticos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novartis AG

<120> Inmunotoxinas Anti-CD3 y usos terapéuticos para las mismas

<130> inmunotoxina

<140>

<141>

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1803

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1803)

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
scFv(UCHT-1)-PE28

<400> 1

atg gcg gac atc cag atg acc cag acc acc tcc tcc ctg tct gcc tct 48
Met Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

120

ctg gga gac aga gtc acc atc agt tgc agg gca agt cag gac att aga 96
Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg
20 25 30

aat tat tta aac tgg tat caa cag aaa cca gat gga act gtt aaa ctc 144
Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
35 40 45

ctg atc tac tac aca tca aga tta cac tca gga gtc cca tca aag ttc 192
Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe
50 55 60

agt ggc agt ggg tct gga aca gat tat tct ctc acc att agc aac ctg 240
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu
65 70 75 80

gag caa gag gat att gcc act tac ttt tgc caa cag ggt aat acg ctt 288
Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
85 90 95

ccg tgg acg ttc gct gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgg gct gga 336
Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Gly
100 105 110

ggc ggt agt ggc ggt gga tcg ggt gga ggc agc ggt ggc gga tct gag 384

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
115 120 125

gtg cag ctc cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct gga gct tca 432
Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
130 135 140

atg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttc act ggc tac acc 480
Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
145 150 155 160

atg aac tgg gtg aag cag agt cat gga aag aac ctt gag tgg atg gga 528
Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met Gly
165 170 175

ctt att aat cct tac aaa ggt gtt agt acc tac aac cag aag ttc aag 576
Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
180 185 190

gac aag gcc aca tta act gta gac aag tca tcc agc aca gcc tac atg 624
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
195 200 205

gaa ctc ctc agt ctg aca tct gag gac tct gca gtc tat tac tgt gca 672

Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

210 215 220

aga tcg ggg tac tac ggt gat agt gac tgg tac ttc gat gtc tgg ggc 720

Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly

225 230 235 240

gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca aaa gct tcc gga ggt ccc gag 768

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Pro Glu

245 250 255

ggc ggc agc ctg gcc gcg ctg acc gcg cac cag gct tgc cac ctg ccg 816

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro

260 265 270

ctg gag act ttc acc cgt cat cgc cag ccg cgc ggc tgg gaa caa ctg 864

Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu

275 280 285

gag cag tgc ggc tat ccg gtg cag cgg ctg gtc gcc ctc tac ctg gcg 912

Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala

290 295 300

gcg cgg ctg tcg tgg aac cag gtc gac cag gtg atc cgc aac gcc ctg 960

Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu
305 310 315 320

gcc agc ccc ggc agc ggc ggc gac ctg ggc gaa gcg atc cgc gag cag 1008
Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln
325 330 335

ccg gag cag gcc cgt ctg gcc ctg acc ctg gcc gcc gcc gag agc gag 1056
Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu
340 345 350

cgc ttc gtc cgg cag ggc acc ggc aac gac gag gcc ggc gcg gcc aac 1104
Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn
355 360 365

ggc ccg gcg gac agc ggc gac gcc ctg ctg gag cgc aac tat ccc act 1152
Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr
370 375 380

ggc gcg gag ttc ctc ggc gac ggc ggc gac gtc agc ttc agc acc cgc 1200
Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg
385 390 395 400

ggc acg cag aac tgg acg gtg gag cgg ctg ctc cag gcg cac cgc caa 1248

Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln
405 410 415

ctg gag gag cgc ggc tat gtg ttc gtc ggc tac cac ggc acc ttc ctc 1296
Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
420 425 430

gaa gcg gcg caa agc atc gtc ttc ggc ggg gtg cgc gcg cgc agc cag 1344
Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln
435 440 445

gac ctc gac gcg atc tgg cgc ggt ttc tat atc gcc ggc gat ccg gcg 1392
Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala
450 455 460

ctg gcc tac ggc tac gcc cag gac cag gaa ccc gac gca cgc ggc cgg 1440
Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg
465 470 475 480

atc cgc aac ggt gcc ctg ctg cgg gtc tat gtg ccg cgc tcg agc ctg 1488
Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
485 490 495

ccg ggc ttc tac cgc acc agc ctg acc ctg gcc gcg ccg gag gcg gcg 1536

Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala
500 505 510

ggc gag gtc gaa cgg ctg atc ggc cat ccg ctg ccg ctg cgc ctg gac 1584
Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp
515 520 525

gcc atc acc ggc ccc gag gag gaa ggc ggg cgc ctg gag acc att ctc 1632
Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu
530 535 540

ggc tgg ccg ctg gcc gag cgc acc gtg gtg att ccc tcg gcg atc ccc 1680
Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro
545 550 555 560

acc gac ccg cgc aac gtc ggc ggc gac ctc gac ccg tcc agc atc ccc 1728
Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
565 570 575

gac aag gaa cag gcg atc agc gcc ctg ccg gac tac gcc agc cag ccc 1776
Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro
580 585 590

ggc aaa ccg ccg cgc gag gac ctg aag 1803

Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
595 600

<210> 2

<211> 601

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<223> Descripción de la Secuencia Artificial:
scFv(UCHT-1)-PE28

<400> 2

Met Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser
1 5 10 15

Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg
20 25 30

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Lys Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu
65 70 75 80

Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu
85 90 95

Pro Trp Thr Phe Ala Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Gly
100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu
115 120 125

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
130 135 140

Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
145 150 155 160

Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Met Gly
165 170 175

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
180 185 190

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
195 200 205

Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
210 215 220

Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
225 230 235 240

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys Ala Ser Gly Gly Pro Glu
245 250 255

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro
260 265 270

Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
275 280 285

Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala
290 295 300

Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu
305 310 315 320

Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln
325 330 335

Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu
340 345 350

Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn
355 360 365

Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr
370 375 380

Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg
385 390 395 400

Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln
405 410 415

Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
420 425 430

Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln
435 440 445

Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala
450 455 460

130

Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg
465 470 475 480

Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
485 490 495

Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala
500 505 510

Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp
515 520 525

Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu
530 535 540

Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro
545 550 555 560

Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
565 570 575

Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro
580 585 590

Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
595 600

<210> 3
<211> 613
<212> PRT
<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 3

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
1 5 10 15

Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
20 25 30

Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
35 40 45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
50 55 60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
65 70 75 80

Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
85 90 95

Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
100 105 110

Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
115 120 125

Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
130 135 140

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160

Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
165 170 175

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
180 185 190

Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
195 200 205

Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
210 215 220

Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
225 230 235 240

Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
245 250 255

Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
260 265 270

Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
275 280 285

Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
290 295 300

Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
305 310 315 320

Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
325 330 335

Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
340 345 350

Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val
355 360 365

Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
370 375 380

Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
385 390 395 400

Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
405 410 415

Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
420 425 430

Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
435 440 445

Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
450 455 460

Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
465 470 475 480

Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
485 490 495

Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
500 505 510

Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
515 520 525

Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
530 535 540

Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
545 550 555 560

Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
565 570 575

Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
580 585 590

Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
595 600 605

Arg Glu Asp Leu Lys
610

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 4

Met His Leu Ile Pro His Trp Ile Pro Leu Val Ala Ser Leu Gly Leu
1 5 10 15

Leu Ala Gly Gly Ser Ser Ala Ser Ala
20 25

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: enlazador de la scFv(UCHT-1)-PE38

<400> 5

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 6

Arg Glu Asp Leu Lys
1 5

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 7

Arg Glu Asp Leu
1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<400> 8

Lys Asp Glu Leu
1

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de l Secuencia Artificial: Péptido Conector de scFv(UCHT-1)-PE38

<400> 9

Lys Ala Ser Gly Gly

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: enlazador de diacuerpo

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 11

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 11

gcggatccga catccagatg acccagacca cc 32

<210> 12

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 12

cctctagaag cccgtttgat ttccagcttg gt 32

<210> 13

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 13

ccaagctttc atgaggagac ggtgaccgtg gtccc 35

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 14

ccgtcgacga ggtgcagctc cagcagtct 29

<210> 15

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 15

ctagaggagg tagtggaggc tcaggaggtt ctggaggtag tg 42

<210> 16

<211> 42

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 16

tcgacactac ctccagaacc tcctgagcct ccactacctc ct 42

<210> 17

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 17

ctggtatcaa cagaaaccag atc 23

<210> 18

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 18

ggtgcctcca gcgaacgtcc acggaag 27

<210> 19

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador

<400> 19

cttccgtgga cgttcgctgg aggcacc 27

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante que comprende un dominio de enlace de CD3, y un mutante de exotoxina de *Pseudomonas* (PE), teniendo este mutante de PE funciones de ribosilación de ADP y translocación, pero una capacidad de enlace celular sustancialmente reducida.

2. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el dominio de enlace de CD3 comprende la región Fv, o un fragmento de CD3 de la misma, de un anticuerpo anti-CD3 humano.

3. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante que comprende un dominio de enlace de CD3 que consiste esencialmente en la región Fv de una sola cadena del anticuerpo UCHT-1 fusionada con un mutante de exotoxina de *Pseudomonas* esencialmente suprimida de su dominio de enlace celular, por ejemplo, el mutante de exotoxina de *Pseudomonas* PE38.

4. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante que tiene la SEQ ID NO:2, y sus sales farmacéuticamente aceptables, y sus homólogos.

5. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante que tiene los residuos 2-601 de la SEQ ID NO:2, y sus sales farmacéuticamente aceptables, o los residuos 3-601 de la SEQ ID NO:2, y sus sales farmacéuticamente aceptables.

6. Una molécula de ácido nucleico que codifica el

polipéptido de inmunotoxina recombinante de la reivindicación 1.

7. Un método para preparar un polipéptido de inmunotoxina recombinante de la reivindicación 1.

8. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéutica efectivamente efectiva de un polipéptido de inmunotoxina recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, junto con un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable para el mismo.

9. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, la cual comprende además un derivado o análogo de espergualina.

10. Un polipéptido de inmunotoxina recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, para utilizarse en la fabricación de una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9.

147

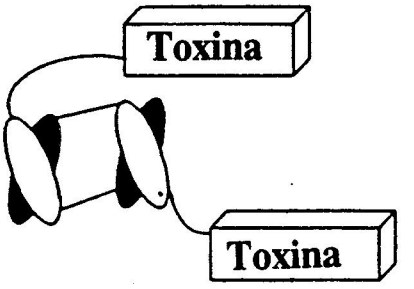
RESUMEN

Se describen polipéptidos inmunotoxina recombinante que comprenden un dominio de enlace de CD3, y un mutante de exotoxina de *Pseudomonas*, y en particular, que comprenden un Fv de una sola cadena (sc) como la fracción de enlace de CD3. Una especie preferida de la invención comprende scFv(UCHT-1)-PE38. También se dan a conocer métodos para la preparación de estas inmunotoxinas; inmunotoxinas funcionalmente equivalentes que son intermediarios en la preparación de las inmunotoxinas de la invención, así como intermediarios de polinucleótidos y oligonucleótidos; métodos para la prevención y/o el tratamiento de rechazo de trasplante e inducción de tolerancia, así como el tratamiento de desórdenes autoinmunes y otros desórdenes inmunes, utilizando las inmunotoxinas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas; y composiciones farmacéuticas que comprenden las inmunotoxinas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

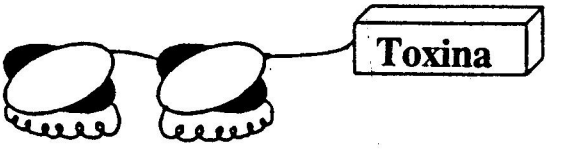
* * * * *

FIGURA 1

A. Diacuerpo



B. Una sola cadena en hilera



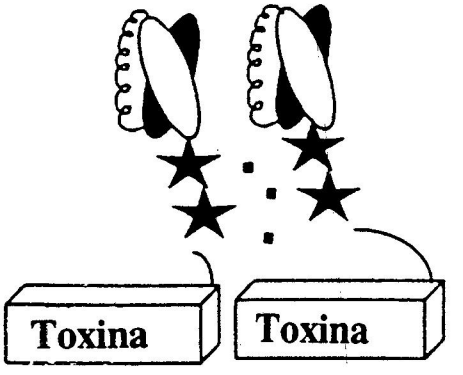
Leyenda: = dominio V_L; = dominio V_H;

Toxina = toxina PE; = dominio de dimerización

= enlace o enlazador de péptido = enlazador flexible

FIGURA 1 (continuación)

C. Dominios de dimerización



D. Toxina de "Minicuerpo"/toxina de Δ minicuerpo

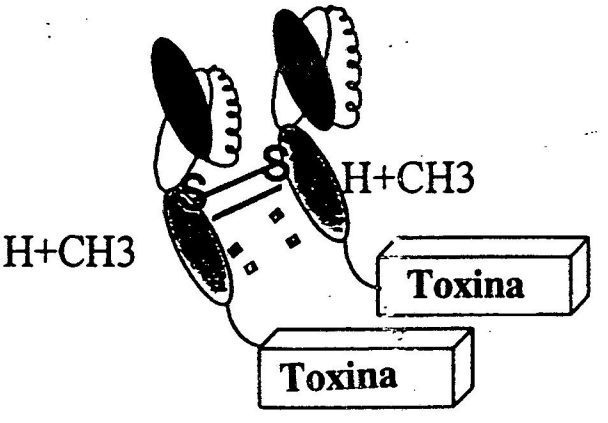
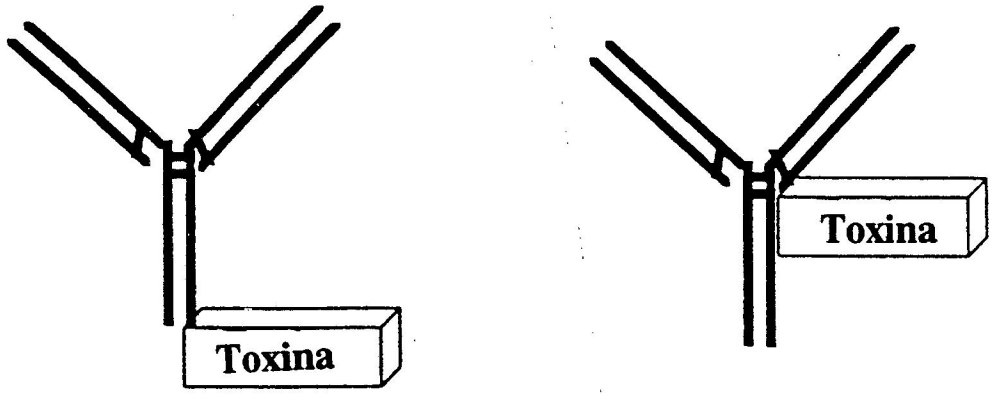
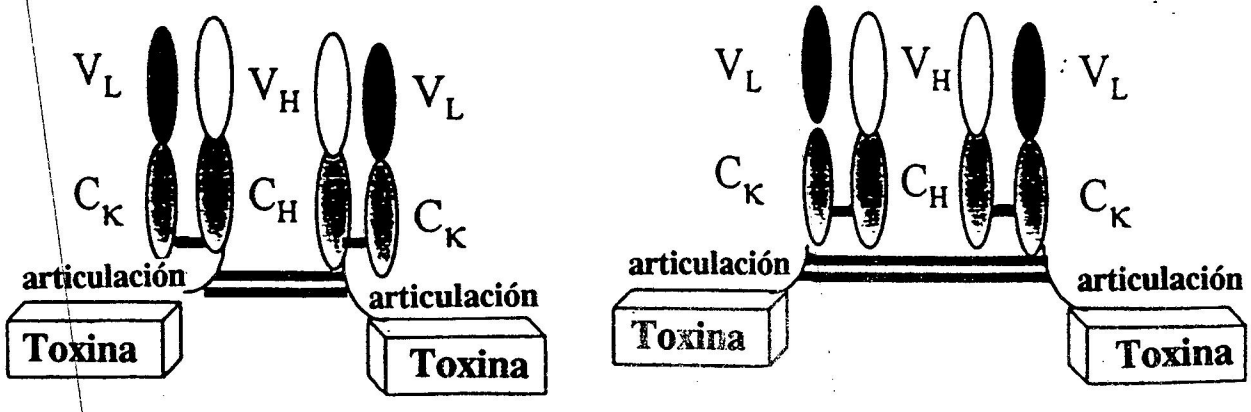


Figura 1 (continuación)

E. Toxina Ab



F. Toxina F(ab')$_2$



EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) *No. SOLICITUD:*

(22) *FECHA DE PRESENTACIÓN:*

(30) *PRIORIDAD:* **SÍ**
(31) *No. DE SOLICITUD:* **09/232445**

(32) *FECHA DE PRESENTACIÓN:* **Enero 15, 1999**

(33) *PAÍS:* **ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA**

(51) *INT. CL.:* **A 61**

(71) *SOLICITANTE:* **NOVARTIS AG. domiciliada en Basilea, Suiza**

(72) *INVENTORES:* **MARY ELLEN DIGAN (Morristown, New Jersey, E.U.A.); PHILIP LAKE (Morris Plains, New Jersey, E.U.A.); RICHARD MICHAEL WRIGHT (Annandale, New Jersey, E.U.A.).**

(74) *APODERADO:* **JIMENA ESCOBAR URIBE**

(54) *TÍTULO:* **INMUNOTOXINAS RECOMBINANTES QUE COMPRENDEN UN DOMINIO DE ENLACE DE CD3, Y UN MUTANTE DE OXOTOXINA A DE PSEUDOMONAS Y USOS TERAPEUTICOS PARA LAS MISMAS.**

(57) *RESUMEN:*

La presente invención se relaciona con un polipéptido de inmutoxina recombinante que comprende un dominio de enlace de CD3, y un mutante de exotoxina de Pseudomonas, y en particular, que comprenden un Fv de una sola cadena (sc) como la fracción de enlace de CD3. Una especie preferida de la invención comprende scFv (UCHT-1) – PE38. También se dan a conocer métodos para la preparación de estas inmunotoxinas; inmunotoxinas funcionalmente equivalentes que son intermediarios en la preparación de las inmunotoxinas de la invención, así como intermediarios de polinucleótidos y oligonucleótidos; métodos para la prevención y/o el tratamiento de rechazo de trasplante de inducción de tolerancia, así como el tratamiento de desórdenes autoinmunes y otros desórdenes inmunes, utilizando las inmunotoxinas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas; y composiciones farmacéuticas que comprenden las inmunotoxinas o sales farmacéuticamente ıceptables de las mismas.

152

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00001786 00000000 Folios: 153
Fecha (AMD): 2000-01-14 15:59:55
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 001 SOLICITUD
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN/TRÁMITE

154

Patente de Invención ☑ **Modelo de Utilidad** ☐

- ☑ Nombre e identificación del solicitante 1 ☐
- ☑ Nombre e identificación del inventor - 1 ☐
- ☑ Título o nombre de la invención - 1 ☐
- ☑ Descripción - 4 ☐
- ☑ Reivindicaciones - 145 ☐
- ☑ Resumen 1 ☐
- ☑ Comprobante de pago - 2 - 3 ☐

COMPLETA ☑ INCOMPLETA ☐

Diseño Industrial ☐

- ☐ Nombre e identificación del solicitante
- ☐ Nombre e identificación del inventor o diseñador
- ☐ Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
- ☐ Representación gráfica
- ☐ Comprobante de pago

COMPLETA ☐ INCOMPLETA ☐

FIRMA RESPONSABLE

Fecha

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

155

153

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 0-1786.

Fecha: 17 de enero del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 16 de Abril de 1997,
del folio 90.643 al folio 90.650
del libro de Protocolo N° 311, obra el
poder N° 17398 conferido por NOVARTIS AG
(NOVARTIS SA) (NOVARTIS INC)
domiciliado(a) en Basilea, Suiza.
al doctor Jimena Escobar Uribe y/o Ignacio
Escobar Uribe.
Representante en Santafé de Bogotá D.C. los
mismos.
Facultad para desistir y sustituir si.

Revisado.

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PRIMER EXAMEN DE FORMA

EXPEDIENTE 0-1786

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).

SI [x] **NO [ ]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de enero del 2000).

SI [x] **NO [ ]** **EXTEMPORANEAMENTE [ ]** Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.

SI [ ] **NO [x]** **NO APLICABLE [ ]** Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).

SI [ ] **NO [x]** **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, **en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses**, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la perdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

SI [ ] **NO [x]** Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,

SI [ ] **NO [x]** Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C.,17 de enero del 2000

EXAMINADOR JURIDICO: Código 202002

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

155

Folio ~~159~~ 157

430
2000-02-21

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
1er EXAMEN DE FORMA

Radicación no 00001786
Concepto Técnico no 300 Clasificación Internacional de Patentes A61K 39/109 // 39/395
C07K 19/00

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención:**

SI ☑ NO ☐	Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
SI ☑ NO ☐	Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
SI ☐ NO ☑	Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
SI ☐ NO ☑	Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
SI ☑ NO ☐	Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
SI ☑ NO ☐	Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
SI ☑ NO ☐	Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
SI ☐ NO ☑	Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
SI ☐ NO ☑	Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
SI ☐ NO ☐	Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
SI ☑ NO ☐	Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104]'en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI ☑ NO ☐	Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
SI ☐ NO ☐	**CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☑ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 21 de febrero / 2000.

202016
EXAMINADOR TÉCNICO

156

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

160

158

372
2000-02-21

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO: 300
EXPEDIENTE: 00001786
IPC: A61K 39/104, A61K 39/395, C07K 19/00

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. El título de la invención hace referencia a "Inmunotoxinas recombinantes que comprenden un dominio de enlace CD3 y un mutante de exotoxina A de Pseudomonas y usos terapéuticos para las mismas". Teniendo en cuenta que el uso no es patentable en Colombia debido a que el artículo 1 de la Decisión 344 no lo menciona de manera explícita, se recomienda modificar el título de manera que corresponda con las reivindicaciones de la solicitud pero no indique que el uso es parte de la invención. Adicionalmente, no es claro si la exotoxina es la exotoxina A o la "a" es un error mecanográfico pues no se menciona en las reivindicaciones ni en el resumen del extracto de publicación.

2. La reivindicación número 7 en su preámbulo indica que el objeto de la invención es un método, pero realmente dicho método no está definido pues no se conocen sus etapas ni pasos, lo único que se sabe es que sirve para preparar una inmunotoxina recombinante. Por consiguiente se sugiere que se elimine esta reivindicación o que se precisen los pasos que comprende dicho método. De acuerdo a las modificaciones que se realicen en esta reivindicación se requiere que se revise el resumen y se efectúen las modificaciones correspondientes.

3. La reivindicación 8 no se encuentra totalmente definida ya que contiene palabras subjetivas como "efectivamente" las cuales no delimitan de manera precisa la invención puesto que no se conoce cual es la cantidad de polipéptido que tiene la composición que se desea proteger. Se recomienda que se omita la mención de la cantidad efectivamente efectiva y se limite esta reivindicación a establecer que la composición... comprende el polipéptido. junto con un diluyente...

4. En consecuencia a lo anterior, sírvase presentar nueva tarjeta temática, nueva tarjeta para el archivo de propietarios y nuevo extracto de publicación.

Santa Fe de Bogotá, 21 de febrero de 2000

/202016

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia

157

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) *No. SOLICITUD:* 00-1786

(22) *FECHA DE PRESENTACIÓN:* 2000-01-14

(30) *PRIORIDAD:* SÍ
(31) *No. DE SOLICITUD:* 09/232445
09/236968
09/414134

(32) *FECHA DE PRESENTACIÓN:* Enero 15, 1999
Enero 25, 1999
Octubre 7, 1999

(33) *PAÍS:* ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

(51) *INT. CL.:* A 61 K39/104, A61K39/395, C07K19/00

(71) *SOLICITANTE:* NOVARTIS AG.
domiciliada en Basilea, Suiza

(72) *INVENTORES:* MARY ELLEN DIGAN (Morristown, New Jersey, E.U.A.); PHILIP LAKE (Morris Plains, New Jersey, E.U.A.); RICHARD MICHAEL WRIGHT (Annandale, New Jersey, E.U.A.).

(74) *APODERADO:* JIMENA ESCOBAR URIBE

(54) *TÍTULO:* **INMUNOTOXINAS RECOMBINANTES QUE COMPRENDEN UN DOMINIO DE ENLACE DE CD3, Y UN MUTANTE DE OXOTOXINA A DE PSEUDOMONAS Y USOS TERAPEUTICOS PARA LAS MISMAS.**

(57) *RESUMEN:*

La presente invención se relaciona con un polipéptido de inmutoxina recombinante que comprende un dominio de enlace de CD3, y un mutante de exotoxina de Pseudomonas, y en particular, que comprenden un Fv de una sola cadena (sc) como la fracción de enlace de CD3. Una especie preferida de la invención comprende scFv (UCHT-1) – PE38. También se dan a conocer métodos para la preparación de estas inmunotoxinas; inmunotoxinas funcionalmente equivalentes que son intermediarios en la preparación de las inmunotoxinas de la invención, así como intermediarios de polinucleótidos y oligonucleótidos; métodos para la prevención y/o el tratamiento de rechazo de trasplante de inducción de tolerancia, así como el tratamiento de desórdenes autoinmunes y otros desórdenes inmunes, utilizando las inmunotoxinas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas; y composiciones farmacéuticas que comprenden las inmunotoxinas o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

158
159

430
2000-03-02

EXPEDIENTE 0-1786

AUTO 0063

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería a la doctora Jimena Escobar Uribe, como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiendo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE
Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 29 FEB. 2000

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 02 MAR 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI____ NO____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA

Carrera 13 N° 27-00 Pisos 5° y 10°
Conmutador 334 1221-2-3-4
Fax 281 3125
Santafé de Bogotá, D.C. - Colombia