



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 429**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03775133 .6**

96 Fecha de presentación : **31.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1525478**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.04.2005**

54 Título: **Subunidad B de la toxina Shiga como vector para el diagnóstico tumoral y la administración de fármacos a tumores que expresan GB₃.**

30 Prioridad: **02.08.2002 EP 02291962**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.12.2009

73 Titular/es: **Institut Curie**
26, rue d'Ulm
75248 Paris Cédex 05, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS),
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) y
Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)

72 Inventor/es: **Johannes, Ludger;**
Florent, Jean-Claude;
Grierson, David;
Maillard, Philippe;
Robine, Sylvie y
Roger, Jacky

74 Agente: **Urizar Anasagasti, Jesús María**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Subunidad B de la toxina Shiga como vector para el diagnóstico tumoral y la administración de fármacos a tumores que expresan GB₃.

La invención se refiere a nuevos compuestos para el tratamiento o diagnóstico del cáncer y más específicamente al uso de un mutante de la subunidad B de la toxina Shiga no tóxica como vector para fármacos o productos de diagnóstico en células receptoras que sobreexpresan GB₃.

A pesar de décadas de investigación clínica y fundamental en el campo de la oncología, las perspectivas a largo plazo de pacientes con enfermedades agresivas siguen siendo desalentadoras. Una de las principales limitaciones de los actuales tratamientos de cánceres, la quimioterapia y radioterapia, es la falta de direccionamiento hacia células cancerosas. El enfoque más razonable y satisfactorio para el direccionamiento implica conjugar ligandos de superficie de células cancerosas específicas (por ejemplo anticuerpos monoclonales, hormonas peptídicas, etc.) con quimioterápicos del cáncer, isótopos radiactivos o toxinas biológicas con la esperanza de promover su localización en células tumorales.

La transformación de células y el desarrollo oncogénico están acompañados por cambios en la expresión y la estructura de los glicosfingolípidos. Generalmente, se cree que estos cambios están relacionados con las funciones propuestas de los glicosfingolípidos en la adhesión de células y señalización celular. De hecho, junto con el colesterol, los glicosfingolípidos son componentes principales de microdominios de membrana ("rafts") que desempeñan un papel central en la agregación del receptor y la interacción del receptor con moléculas de señalización, tales como cinasas de la familia Src. Además, se evalúa actualmente un papel de los glicosfingolípidos y microdominios de membrana en la clasificación intracelular. Según la denominada "hipótesis raft" propuesta por Simons y colaboradores, la asimetría en la distribución de lípidos y proteínas en el plano lateral de las membranas contribuye a la clasificación de las membranas hacia distintos destinos intracelulares.

La globotriaosil ceramida GSL (Gb₃ o CD77) se expresa en una estrecha gama de células B comprometidas y está asociada a linfomas de células B (Gordon *et al.*, 1983; Kalisiak *et al.*, 1991; Mangeney *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 1985; Oosterwijk *et al.*, 1991). De hecho, se notificó recientemente que podían detectarse sitios de unión para ligandos específicos de Gb₃ en todos los grados de linfomas de células del centro folicular, siendo positivas más del 70% de las muestras de tumores de pacientes (LaCasse *et al.*, 1999). Se encontró también que el 30-40% de las muestras de pacientes con linfomas linfocíticos pequeños, linfomas de células B grandes o mieloma múltiple eran positivas. Se sometieron a prueba hiperplasias ováricas (Arab *et al.*, 1997) y suspensiones celulares obtenidas de tumores de mama humanos (LaCasse *et al.*, 1999) y eran positivas para Gb₃. Finalmente, Gb₃ aumentaba también notablemente en varias líneas celulares derivadas de astrocitomas humanos (Arab *et al.*, 1999).

En vista de la expresión de Gb₃ descrita en células cancerosas humanas es tentador proponer el uso del lípido para fines de vectorización. Se han descrito ligandos naturales de Gb₃, que abarcan las toxinas proteicas bacterianas toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* y las verotoxinas de *Escherichia coli* (Lingwood, 1996; Sandvig y van Deurs, 1996). Estas toxinas están compuestas por dos subunidades. La subunidad A enzimática modifica el ARN ribosómico conduciendo así a una inhibición de la biosíntesis de proteínas. Para la unión celular y el transporte intracelular, la subunidad A tiene que interaccionar con la subunidad B no tóxica, un homopentámero de 5 fragmentos B. La subunidad B se une, en ciertas condiciones, de una manera cooperativa a 10-15 moléculas de Gb₃. Este agrupamiento conduce a la asociación de la toxina con microdominios de membrana, un acontecimiento importante para el tráfico intracelular de la toxina (Falguières *et al.*, 2001). En células sensibles a la toxina, la toxina Shiga y su subunidad B no tóxica se dirigen mediante transporte retrógrado desde la membrana plasmática hasta el retículo endoplasmático, a través del endosoma temprano y el aparato de Golgi (para una revisión, véase (Johannes, 2002)). Al nivel del retículo endoplasmático, la subunidad A pasa entonces mediante retranslocación a través de la membrana al interior del citosol. Es importante observar que algunos tipos de células son resistentes a la acción de la toxina, a pesar de la expresión de Gb₃ (Falguières *et al.*, 2001). Esto está relacionado probablemente con un patrón de transporte intracelular alterado en estas células (Falguières *et al.*, 2001).

El documento WO 99/03881 da a conocer la selección como diana de células que expresan el receptor Gb₃ usando la subunidad B de la toxina Shiga como portador unido directamente a un agente polipeptídico o polinucleotídico de interés terapéutico.

La holotoxina Shiga se ha descrito como un agente antitumoral en trasplantes de xenoinjertos en ratones (Arab *et al.*, 1999). Además, elimina células tumorales clonogénicas en aplicaciones de purga (LaGasse *et al.*, 1996). Sin embargo, el uso de la holotoxina como agente terapéutico tiene importantes limitaciones. En primer lugar, la acción de la subunidad A de la toxina no es específica de células tumorales. En segundo lugar, la holotoxina es una proteína grande cuya capacidad para infiltrarse en tumores sólidos es limitada. En tercer lugar, una proteína bacteriana grande como la holotoxina conduce a una respuesta inmunitaria eficaz. En cuarto lugar, la necesidad de mantener la unión simultánea de Gb₃ y la subunidad A limita la posibilidad de introducir mutaciones que favorecen la evasión inmunitaria o el direccionamiento intracelular.

En esta invención, se ha usado por tanto la subunidad A de la toxina Shiga como medio de vectorización de células cancerosas, en ausencia de la subunidad B. Se usó un mutante de la subunidad B construido previamente que permite el acoplamiento químico de sitio dirigido a la subunidad B, conservando su interacción con Gb₃.

Más particularmente, se ha diseñado el mutante de la subunidad B, o derivado denominado STxB-Z(n)-Cys, en el que n es 0 ó 1. En esta proteína, se añade una cisteína al extremo C terminal de la STxB madura. La proteína, cuando se purifica de bacterias, porta el enlace disulfuro interno, como la STxB de tipo natural, mientras que el grupo sulfhidrilo en la Cys C-terminal está libre. Debido a su nucleofilicidad, los grupos sulfhidrilo son excelentes aceptores para enfoques de acoplamiento dirigido (Philippe Schelté *et al.*, 1999).

Estos mutantes pueden usarse como portadores universales para dirigir moléculas a células que expresan el receptor Gb₃.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto híbrido para la fabricación de una composición para el diagnóstico o el tratamiento de células tumorales intestinales que sobreexpresan el receptor Gb₃, que tiene la siguiente fórmula: STxBZ(n)-Cys-Y(m)-T, en la que:

- STxB es la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente funcional de la misma,
- Z es un aminoácido que carece de grupo sulfhidrilo, siendo n 0, 1 o un polipéptido,
- Cys es el aminoácido cisteína,
- T es una molécula unida mediante un enlace covalente a la parte de S de la Cys, seleccionado de un grupo que comprende:
 - agentes para el diagnóstico *in vivo*,
 - agentes citotóxicos,
 - profármacos,
 - enzimas para la conversión de un profármaco en un fármaco,
- Y es un ligador entre T y Cys, siendo dicho ligador escindible o no para la liberación de T tras la internalización del compuesto híbrido en dichas células, siendo m 1 ó 0.

En la invención, T está operativamente unido a Cys directamente a través de una unión covalente o indirectamente a través de un ligador, Y, que permite o no dicha liberación del resto T.

En una realización preferida, n = 0, y el portador universal tiene la siguiente secuencia (SEQ ID No 1):

NH₂ – MKKTLIAASLSFFSASALATPDCVTGKVE YTKYNDD
 DTFTVKVGDKELF TNRWNLQSLLSAQITGMTVTIKTNACHNGGGFSEVI
 FRC – COOH

En realidad, si el ligador Z es demasiado largo, es decir, cuando n es igual o mayor de 2, podrían producirse algunos puentes disulfuro internos, e impiden o bien la unión de STxB al receptor Gb₃ e impiden especialmente la unión a la molécula de interés.

La invención resulta de la constatación de que las células cancerosas, y más particularmente los tumores, y más particularmente los tumores intestinales y colorrectales, sobreexpresan el receptor Gb₃, tal como puede observarse en la tabla 1, figura 1 y figura 2 más adelante en el presente documento. Gb₃ no está presente en epitelios intestinales normales en

La invención resulta de la observación de que las células cancerosas, y más particularmente los tumores, y más particularmente los tumores intestinales y colorrectales, sobreexpresan el receptor Gb₃, tal como puede observarse en la figura 1, figura 2 y figura 10 más adelante en el presente documento. Gb₃ no está presente en epitelios intestinales normales en seres humanos (Jones *et al.*, 2000). Por consiguiente, se ha mostrado que Gb₃ está presente en niveles de bajos a indetectables en el ratón. Por el contrario, Gb₃, se sobreexpresa en la línea celular de cáncer de colon humano CaCO2 (Jones *et al.*, 2000). Por tanto, constituye un excelente marcador para distinguir entre células tumorales y células intestinales normales tanto en seres humanos así como en modelos murinos. Este patrón diferencial de expresión de Gb₃ proporciona la base para los nuevos desarrollos terapéuticos y de diagnóstico de la presente invención en cáncer colorrectal, y más generalmente en cualquier célula cancerosa o tumoral que sobreexpresen Gb₃. La sobreexpresión de Gb₃ en células puede someterse a ensayo llevando a cabo un método tal como el dado a conocer en el ejemplo 1 cuando se somete a ensayo el modelo de ratón, partiendo especialmente de material de biopsia. Otro método abarca realizar

una MRI para la determinación de la distribución de Gb₃. Sin embargo, en algunas situaciones, la confirmación de que el tumor que va a tratarse es un tumor que sobreexpresa Gb₃ no se busca específicamente antes de la iniciación del tratamiento.

Según la invención, la expresión “tratamiento terapéutico” abarca la acción del compuesto híbrido de la invención que da como resultado un efecto beneficioso para el paciente que se somete al tratamiento, obteniéndose dicho efecto o bien a un nivel celular o bien a un nivel clínico, incluyendo abarcar como resultado una mejora del estado del paciente o un estado de remisión o una recuperación de un estado de salud. En la presente invención, dicho tratamiento terapéutico se proporciona a un paciente que tiene un tumor y que padece especialmente un cáncer.

Según la invención, el término “diagnóstico” abarca la detección de un estado patológico o la detección de uno o varios parámetros que pueden correlacionarse de manera o bien directa o bien indirecta, posiblemente en combinación con otros parámetros, con un estado patológico y que pueden proporcionar información útil en un protocolo de diagnóstico. El término también abarca la posible detección cuantitativa de parámetros relacionados con un estado patológico de este tipo.

En una realización, los compuestos híbridos de la invención pueden llevar un resto T que es un agente de contraste para la detección de células cancerosas que expresan Gb₃ mediante técnicas de obtención de imágenes en vivo tales como obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI). Otras técnicas de obtención de imágenes en vivo no invasivas incluyen microscopía de dos fotones, ultrasonidos potenciados por contraste, rayos X potenciados por contraste, tomografía computarizada, exploración con isótopos, termografía potenciada por contraste.

Más particularmente, dichos agentes de contraste pueden seleccionarse de un grupo que comprende compuestos paramagnéticos, tales como porfirin-gadolinio, porfirin-manganeso, polímero sintético de gadolinio, ácido gadolinio-etoxibencil-dietilentriaminapentaacético, DOPTA-gadolinio, ferrofluido y nanopartículas, que se administran entonces a seres humanos y animales.

La presente invención también da a conocer el uso de tales compuestos para el diagnóstico *in vivo* de tumores, más específicamente para diagnóstico mediante MRI. El uso es ventajoso para cánceres intestinales y colorrectales siempre que se haya mostrado que los receptores Gb₃ se expresan específicamente en células cancerosas pero no en células normales.

El otra realización, los compuestos híbridos de la invención pueden llevar como resto T un profármaco o fármaco específico de tumor que se vectoriza hacia rutas de transporte específicas de tumor en células cancerosas positivas para Gb₃ permitiendo el aumento de la eficacia y/o especificidad de estos tratamientos. El resto T también podría ser un activador de profármacos mientras que el profármaco solo se administra directamente mediante cualquier sistema de administración de fármacos conocido, es decir, mediante administración sistémica, transdérmica, oral, rectal.

En general, el uso de la subunidad B como medio de direccionamiento hacia el cáncer tiene las siguientes ventajas. En primer lugar, debido a su pequeño tamaño, la penetración en el tejido con la subunidad B es eficaz. En segundo lugar, la respuesta de anticuerpos frente a la subunidad B es ineficaz. En tercer lugar, pueden acoplarse compuestos selectivos de tumor a la subunidad B. En cuarto lugar, pueden aprovecharse rutas de transporte específicas de tumor para aumentar la eficacia del tratamiento. En quinto lugar, cuando se realizan modificaciones de la subunidad B, sólo necesita conservarse la capacidad de unión a Gb₃.

En un aspecto de la invención, el fármaco es un fármaco fotosensibilizador adecuado para fototerapia dinámica (FTD). La FTD es una técnica recientemente desarrollada para el tratamiento de tumores sólidos en seres humanos. Se basa en el direccionamiento y la fotoactivación de colorantes tales como porfirinas o sistemas relacionados dentro del tejido tumoral. Los acontecimientos moleculares comienzan a entenderse, tales como la muerte celular a través de apoptosis y otros mecanismos, que implican a las mitocondrias, los núcleos, etc. Algunos fármacos fotosensibilizadores se usan ya en la práctica clínica (Photofrin®, Foscan®, etc.). Sin embargo, estas sustancias tienen varios inconvenientes, lo más notablemente la ausencia de direccionamiento específico de tumor. Se han propuesto varias estrategias para mejorar la selectividad de tumor de los fotosensibilizadores. Incluyen el uso de sistemas de administración adaptados tales como liposomas, lipoproteínas, anticuerpos monoclonales, nanopartículas para modificar la biodistribución de los colorantes. Otro enfoque desarrollado en el Instituto Curie es modular la anfifilicidad del macrociclo. Las modificaciones estructurales inducidas mediante glicoconjugación del sistema tetrapirrólico son un medio eficaz para crear un equilibrio entre hidrofiliidad e hidrofobicidad. Siguiendo este enfoque, se prepararon macrociclos tetrapirrólicos tri y tetraglicoconjugados neutros y se evaluaron *in vitro* para determinar su fototoxicidad (Mometeau *et al.*, 1999).

Por tanto, se ha sintetizado un macrociclo tetrapirrólico relativamente hidrófilo, glicoconjugado (porfirina), que porta un grupo bromo-bencilo que permite el acoplamiento a STxB/Cys. La síntesis, el acoplamiento a STxB/Cys y la purificación del compuesto resultante se describen a continuación en el presente documento. Cuando se logra el contacto con células tumorales, el compuesto terapéutico compuesto por STxB/Cys y la porfirina glicoconjugada se acumula de manera estable en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Entonces puede activarse localmente la fototoxicidad de la porfirina mediante irradiación con luz visible tras el aclaramiento del compuesto citotóxico de las células que necesitan conservarse, tales como células dendríticas en las que STxB no selecciona como diana la ruta retrógrada (Falguieres *et al.*, 2001).

En otro aspecto de la invención, T es un agente citotóxico. Dicho agente citotóxico podría ser tóxico para la célula tras su internalización o bien directa o bien indirectamente a través de la acción de un segundo componente, actuando dicho segundo componente como un medio para transformar un profármaco en un fármaco citotóxico.

5 Un ejemplo de agente citotóxico es neocarzinostatina (NCS). En este caso, $m = 0$ y T es la holo-NCS.

La holo-neocarzinostatina (holo-NCS) es el prototipo de la familia de proteínas antibióticas. Es un complejo de 11,3 kDa que consiste en un antibiótico dodecadina (NCS_{Chrom}) que contiene la actividad citotóxica, unido reversiblemente a una proteína portadora conocida como apo-neocarzinostatina (apo-NCS) (para una revisión, véase (Favaudon, 1982)).
 10 La holo-NCS es activa en el intervalo nanomolar, y NCS_{Chrom} escinde el ADN en el transcurso de una reacción suicida sin dejar fármaco activo residual tras unos pocos minutos de incubación. No se ha notificado resistencia a NCS_{Chrom} asociada a la importación reducida del fármaco (MDR).

Las principales lesiones en el ADN inducidas por NCS_{Chrom} en el ADN resultan del ataque por radicales y consisten
 15 en una rotura del extremo romo que lleva un residuo de timidina-5'-aldehído en una hebra, con un sitio abásico a un intervalo de dos nucleótidos en la hebra complementaria. Este sitio abásico es el sustrato para la endonucleasa III de manera que el daño inducido por NCS_{Chrom} se convierte muy rápidamente en roturas de la doble hebra del ADN en células vivas. Mutantes de *E. coli*, células de mamífero o levaduras defectuosos en cualquier ruta de la reparación de roturas de la doble hebra, lo más notablemente a través de un defecto en la proteína cinasa dependiente de ADN, son
 20 consecuentemente hipersensibles a la destrucción celular inducida por NCS.

La purificación de NCS, el método de obtención del compuesto híbrido en el que NCS está unido covalentemente a Cys y el efecto citotóxico de este compuesto híbrido se ilustran en el ejemplo 1 más adelante en el presente documento.

25 En otra realización de los compuestos híbridos de la invención, T es un profármaco y $m = 1$. Los profármacos se definen como agentes terapéuticos que son inactivos pero que se transforman en metabolitos activos mediante biotransformación. El profármaco se transforma entonces mediante un segundo componente dentro de la célula tras la internalización del compuesto híbrido. Dicho segundo componente podría ser un metabolito celular tal como una enzima. Un ejemplo de esta realización es un compuesto híbrido en el que T es un fármaco citotóxico tal como antraciclinas
 30 (daunomicina, doxorubicina, daunorubicina, etc.), idarubicina, cis-platino, mitomicina C, desacetilvinblastina, metotrexato, N-acetilmelfalán, 5-fluorouracilo, mostazas de nitrógeno, caliqueamicina, maitansinoides, e Y es un ligador sensible a una enzima endógena tal como una manosidasa.

Otra realización incluye el enfoque descrito por (Saxon y Bertozzi, 2000). Un precursor de azúcar que contiene
 35 un grupo azido se dirige a células cancerosas mediante STxB/Cys. Tras la liberación del azúcar que porta azido en el aparato de Golgi, el último se integra en las cadenas de hidratos de carbono de la célula cancerosa. En interacción con un profármaco que porta fosfina, se libera un compuesto terapéutico que actúa específicamente en el entorno tumoral.

Otra realización incluye el uso de amidoximas (N-hidroxiamidinas) como profármacos, escindibles mediante re-
 40 ductasas endógenas.

Varias reductasas son responsables de la reducción de amidoximas a amidinas. Se ha purificado un sistema enzimático microsómico del hígado humano y porcino que consiste en citocromo b5, su reductasa y una isoenzima P450 (Clement B *et al.*, 1997). Un sistema enzimático similar está presente en las mitocondrias. Se ubican actividades
 45 reductoras en varios órganos tales como el hígado, riñón, pulmón e incluso el cerebro.

En otra formulación, se preparan profármacos que incorporan enlaces que son sensibles a manosidasa. Los profármacos se acoplan a STxB/Cys y se dirigen a células cancerosas que expresan Gb₃. En este caso, la activación del profármaco se produce en el aparato de Golgi de la célula cancerosa que usa la manosidasa endógena sin vectorización
 50 anterior de la enzima.

En otra realización, dicho segundo componente en un compuesto híbrido según la invención en el que T es una enzima para la transformación del profármaco en un fármaco, cuando dicha enzima no está presente endógenamente o no está presente en el compartimento seleccionado como diana de la célula, es decir, el aparato de Golgi.
 55

Un ejemplo es el uso de profármacos que contienen ácido glucurónico conjugado a través de un resto ligador al aminoglicósido de la doxorubicina. Tales profármacos se sintetizan tal como se describe en (Bakina y Farquhar, 1999). El profármaco de antraciclina puede convertirse en doxorubicina mediante la β -glucuronidasa. En este caso, el resto T del segundo compuesto es la β -glucuronidasa. En una primera etapa, se acopla la β -glucuronidasa a STxB/Cys tal como se describe a continuación en el presente documento para BSA y NCS. El producto de acoplamiento se dirige al aparato de Golgi (figura 13) y al retículo endoplasmático de células tumorales que expresan Gb₃ y se retiene en este compartimento. En otras células, tales como células dendríticas, el producto de acoplamiento se degrada rápidamente (Falguières *et al.*, 2001). En una segunda etapa, el profármaco se acopla a STxB/Cys. El producto puede activarse en células que han retenido el producto de acoplamiento STxB/Cys- β -glucuronidasa (células cancerosas), pero no en
 65 células que han perdido este producto (células dendríticas).

En otra realización, el profármaco es un análogo de nucleótidos que, tras su transformación enzimática, puede incorporarse en el ADN en replicación y detener dicha replicación. Tales profármacos para terapia génica suicida

contra el cáncer se revisan en Singhal S. *et al.* (1999). Un ejemplo es un compuesto híbrido en el que T es ganciclovir (GCV) o aciclovir (ACV), e Y es un ligador escindible mediante una enzima endógena tal como manosidasa. El segundo componente es un segundo compuesto híbrido en el que T es la timidina cinasa del virus del herpes simple (VHS₁-TK). Esta enzima puede convertir GCV o ACV en GCV monofosfato o ACV-monofosfato. Estos nucleósidos monofosfato se fosforilan entonces para dar análogos de nucleótidos difosfato y trifosfato mediante cinasas endógenas. GCV-trifosfato carece del OH 3' en la desoxirribosa así como del enlace entre los carbonos 2' y 3' que son necesarios para la elongación de la cadena de ADN. Como resultado, la integración de GCV-trifosfato provoca una terminación prematura de la cadena de ADN y conduce a apoptosis.

Por tanto, la presente invención abarca también:

- compuestos híbridos en los que Y es un ligador escindible enzimáticamente seleccionado de un grupo que comprende folatos reducidos y no reducidos escindibles mediante carboxipeptidasa G, grupos fosfato de profármacos fosforilados escindibles mediante fosfatasa alcalina, compuestos escindibles hidrolíticamente mediante carboxipeptidasa A, nitrorreductasa para la activación de profármacos, hidrólisis de un anillo de lactama escindible mediante beta-lactamasa, amida escindible mediante penicilina amidasa, citosina desamidasa para la activación de profármacos, ácido glucurónico escindible mediante beta-glucuronidasa, galactosa escindible mediante galactosidasa, manosa escindible mediante manosidasa.
- compuestos híbridos en los que Y se selecciona de un grupo que comprende ligadores no selectivos tales como ácido glutárico, dianhídrido de ácido dietilentriaminapentaacético, carbodiimida, etc., ligadores escindibles mediante ácido tales como anhídrido cis-acetónico, acil hidrazonas, bases de Schiff, ligadores de tritilo, ligadores de disulfuro degradables lisosómicamente, tales como SPDP.

El experto puede adaptar fácilmente esta estrategia de conversión de profármacos usando los compuestos híbridos según la invención para cualquier principio de profármaco, y más particularmente a las terapias suicida complementaria y múltiple. El efecto sinérgico de la estrategia suicida múltiple permite dosis inferiores o fármacos individuales para una sensibilidad máxima y reduce la citotoxicidad en células no transducidas. Además, el desarrollo de resistencia a la estrategia suicida se reduce en gran medida cuando se seleccionan como diana dos (o más) rutas separadas.

La presente invención da a conocer el uso de unos compuestos híbridos de fórmula STxB-Z(n)-Cys-Y(m)-T para los tratamientos de células que expresan Gb₃. Un ejemplo de estas células son células intestinales, y particularmente colorrectales que expresan el receptor Gb₃ sólo cuando son células tumorales.

Por consiguiente, STxB-Z(n)Cys-Y(m)-T tal como se define en la presente invención proporciona medios para el tratamiento de estados patogénicos incluyendo tumores o cáncer asociado a la sobreexpresión del receptor Gb₃ en células tumorales.

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen al menos un compuesto híbrido de fórmula STxB-Z(n)-Cys-Y(m)-T para el diagnóstico o el tratamiento de cánceres que tienen sobreexpresión de células receptoras Gb₃, en combinación con portadores farmacéuticos aceptables.

Debe entenderse en el presente documento que las composiciones farmacéuticas se aplican o bien para el diagnóstico *in vivo* o bien para el tratamiento de células cancerosas o tumores y que podrían contener cualquiera de los compuestos híbridos descritos en el presente documento.

Una composición farmacéutica según la invención comprende ventajosamente uno o más componentes que van a administrarse en una etapa o secuencialmente en el tiempo. Por ejemplo, un primer componente de la composición farmacéutica contiene como componente activo un compuesto híbrido en el que T es una enzima, y por ejemplo β -glucuronidasa que se administra en primer lugar a un paciente que porta un tumor que tiene sobreexpresión de células receptoras Gb₃; el primer componente se administra una vez a tales pacientes; el segundo componente de la composición farmacéutica contiene un compuesto híbrido según la invención en el que T es un profármaco e Y es ácido glucurónico; este segundo componente de la composición farmacéutica podría administrarse al paciente secuencialmente en el tiempo con administraciones repetidas para obtener un efecto a largo plazo del tratamiento.

Una composición farmacéutica según la invención es particularmente interesante para el tratamiento de tumores intestinales y más particularmente para tumores colorrectales siempre que, se ha demostrado en el presente documento, en primer lugar que estos tumores expresen específicamente el receptor Gb₃ y en segundo lugar que las composiciones farmacéuticas que llevan los portadores farmacéuticos para la administración oral o rectal sean eficaces tras una administración oral o rectal de la composición farmacéutica.

La presente invención también da a conocer un método para inducir la muerte de células cancerosas que llevan receptores Gb₃ que se sobreexpresan, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de al menos un compuesto híbrido descrito en el presente documento anteriormente, de manera que se produzca la muerte de las células cancerosas.

Por consiguiente, la invención se refiere en particular a medios adecuados para el diagnóstico *in vivo* de tumores o el diagnóstico *in vivo* del cáncer.

La invención también da a conocer un método para el diagnóstico *in vivo* de células tumorales o cancerosas que sobreexpresan el receptor Gb₃, comprendiendo este método administrar una cantidad eficaz de un compuesto híbrido que tiene un resto T que es un agente de contraste.

El método para la fabricación de un compuesto híbrido de la invención se describe en el documento WO02060927. Binfes:

La parte universal del compuesto híbrido, es decir, STxB-Z(n)-Cys podría fabricarse mediante una línea celular recombinante obtenida mediante transformación con un plásmido o vector recombinante que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica para la parte STxB-Z(n)-Cys del compuesto híbrido. Más particularmente, la secuencia que incluye tal molécula es un polinucleótido aislado seleccionado del grupo de:

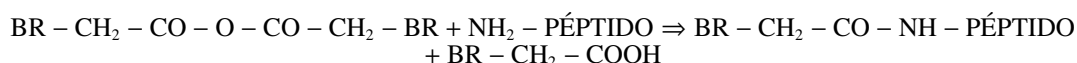
- (a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos de STxB que codifica para la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente funcional de la misma que lleva en su extremo 3' el codón TGT, o el codón TGC que codifica para cisteína;
- (b) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con una secuencia de nucleótidos que codifica para la subunidad B de la toxina Shiga o un equivalente funcional de la misma que lleva en su extremo 3' el codón TGT o TGC; y
- (c) una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de a) o b).

Los enfoques de acoplamiento para la unión covalente del resto -Y(m)-T a STxB-Z(n)-Cys, siendo m 0 ó 1, pueden ser cualquier método o procedimiento descrito o llevado a cabo por un experto.

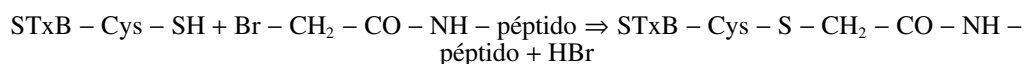
Un primer método que puede realizarse es el uso del agente reticulante hetero-bi-funcional SPDP descrito por Carlsson *et al.* Sin embargo, SPDP puede escindirse mediante tiolasas séricas, lo cual es una causa de la disminución del rendimiento de la reacción.

Un segundo método para el acoplamiento covalente de péptidos STxB-Z(n)-Cys con otro péptido de interés es producir funciones bromoacetilo o maleimida en este último tal como se describe por P. Schelte *et al.* En resumen, el péptido de interés se activa químicamente con anhídrido de bromoacetato o mediante un grupo maleimida respectivamente. En condiciones de reacción apropiadas (pH, temperatura, tiempos de incubación), estos grupos se eliminan mediante cis-eliminación, que se produce respectivamente en enlaces covalentes -S-S-, -SCH₂-, -S-CO- o -S-NH.

Como ejemplo, el polipéptido o el péptido que va a acoplarse al resto -SH de la cisteína C-terminal del portador universal, tiene su extremo N-terminal activado con anhídrido bromoacético siguiendo el esquema de reacción:



La función bromoacetilo tiene alta quimioselectividad por grupos tioles de péptidos y el péptido activado puede hacerse reaccionar con STxB-Cys tal como sigue:



El enlace tioéter resultante es estable en hidrólisis.

Otro método para acoplar una molécula al portador universal de la invención es usar MBS (éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) tal como se muestra en la figura 9. Este acoplamiento permite el transporte y procesamiento de grandes moléculas tales como enzimas.

Otro ejemplo para el acoplamiento de moléculas complejas tales como metaloporfirinas se muestra en el ejemplo 2 más adelante en el presente documento.

Sin limitar el alcance de los compuestos híbridos de la invención, su uso y las composiciones farmacéuticas, los ejemplos y figuras más adelante en el presente documento ilustran las ventajas de la presente invención.

Leyendas de las figuras

Figura 1: Captación de STxB por tumores intestinales tras 2,5 h, comparación con tejido normal. Paneles superiores: duodeno normal. Paneles inferiores: tumor de la región periampular. Paneles de la izquierda: los núcleos están teñidos con colorante Hoechst. Paneles de la derecha: tinción anti-STxB.

Figura 2: En tejido normal, las células enteroendocrinas captan STxB. Se muestra una región de duodeno normal. Tinción nuclear con Hoechst (panel superior izquierdo), anticuerpo anti-cromogranina A/B (panel superior derecho) y anticuerpo anti-STxB (panel inferior izquierdo). El panel inferior derecho muestra una superposición de las tres tinciones: núcleos (azul), cromogranina A/B (rojo), STxB (verde). El color amarillo demuestra la localización conjunta de la cromogranina y STxB.

Figura 3: Captación de STxB por tumores intestinales tras 24 h, comparación con tejido normal. Paneles superiores: duodeno normal. Paneles inferiores: tumor de la región periampular. Paneles de la izquierda: los núcleos están teñidos con colorante Hoechst. Paneles de la derecha: tinción anti-STxB.

Figura 4: STxB no está presente en tejido control (hígado), incluso tras 24 h: Paneles superiores: un animal control no tratado. Paneles inferiores: animal tratado con STxB tras 24 h de incubación. Paneles de la izquierda: tinción nuclear (Hoechst), paneles de la derecha: tinción anti-STxB.

Figura 5: Estructura de la metaloporfirina soluble en agua que se acopla a STxB/Cys.

Figura 6: Síntesis de compuestos que se acoplan a STxB/Cys para funcionar como agentes de contraste en RMI (II-M) o como fármacos citotóxicos antitumorales para PDT (II).

Figura 7: Espectro de absorción óptica de holo-NCS/STxB tras la incorporación de NCS_{Chrom} y filtración sobre sephadex G25 para eliminar NCS_{Chrom} en exceso, no específicamente unida.

Figura 8: Resumen del efecto de baja temperatura (0°C) y PPMP sobre la respuesta de células HeLa a holo-NCS/STxB u holo-NCS 4 nM (en relación con NCS_{Chrom}). Los blancos se tratan en hielo para el control.

Figura 9: Esquema del método de acoplamiento de MBS.

Figura 10: Sobreexpresión de Gb₃ por tumores humanos y murinos. (A) Experimento de recubrimiento con STxB sobre GSL neutra extraída de muestras de tejido normal (ctrl.) y tumoral obtenidas de ratones Ras-APC. (B) Cuantificación de la expresión de Gb₃ en muestras de tejido intestinal normal (barras blancas) o tumoral (barras grises). Los promedios se muestran en barras negras. (C) Experimento de recubrimiento con STxB sobre GSL neutra extraída de tejido de colon humano normal (ctrl.) y tumoral. (D) Representación de la sobreexpresión de Gb₃ por tumores de colon humanos. Los resultados se expresan como la razón de expresión de Gb₃ en tumores con respecto a la expresión de Gb₃ en el tejido adyacente normal obtenido del mismo paciente. Se representan seis experimentos independientes (barras blancas) y su promedio (barra negra).

Figura 11: Obtención de imágenes de tumores usando microscopía multifotónica. (A,B,C) Aspecto del tejido intestinal no tratado, revelado mediante autofluorescencia en un tejido no fijado ni teñido. (A) Vellosoidades en el duodeno. (B) Células epiteliales alineadas en tejido normal. (C) Células escalonadas con núcleos agrandados en tumor desdiferenciado. (D,E) Experimento de alimentación por sonda con Cy5-STxB. El tejido tumoral está marcado intensamente, mientras que el tejido normal circundante aparece oscuro, debido a regímenes de excitación reducidos, en comparación con (A-C).

Figura 12: Vectorización de glico-porfirina H2TPP(p-O-b-D-GluOAc)3(p-CH2Br) hacia células cancerosas. La línea azul superior (cuadrados en blanco) informa de la respuesta de células HeLa en las que se inhibió la expresión de Gb₃ usando PPMP. La línea roja inferior (círculos en blanco) informa de las células HeLa control. Obsérvese que la supervivencia se ve afectada significativamente sólo en células HeLa en las que se expresa Gb₃, mostrando la administración dependiente de receptor de la glico-porfirina H2TPP(p-O-b-D-GluOAc)3(p-CH2Br) a células cancerosas, a través de STxB.

Figura 13: Análisis del direccionamiento de β -GUS dependiente de STxB hacia la ruta retrógrada de células cancerosas. Obsérvese el recubrimiento perfecto del marcaje (amarillo, panel más inferior) obtenido con los anticuerpos dirigidos contra STxB (rojo, panel más superior) y β -GUS (verde, panel del medio).

Figura 14: Vectorización de la actividad de β -GUS sobre células cancerosas. Se facilita la actividad de β -GUS en unidades arbitrarias. Obsérvese que las células HeLa que expresan Gb₃ (células Gb₃+) muestran un aumento significativo de la actividad de β -GUS de manera comparativa con células que no la expresan (células Gb₃-). La actividad de β -GUS purificado se muestra como control.

Figura 15: Mapa T2 cuantitativo calculado de las cuatro preparaciones de células. Obsérvese que las células con las que se han asociado NP aparecen oscuras.

NP no recubiertas se unen fácilmente y de manera no específica a células HeLa. El recubrimiento con BSA (NP-BSA) reduce la unión no específica. NP funcionalizadas con STxB NP (STxB-Cys-MBS-BSA-NP) se unen a células HeLa de una manera dependiente de receptor.

Figura 16: Direccionamiento de biotina acoplada a STxB-EDEKKK hacia el aparato de Golgi de células HeLa. La biotina se acopla a STxB-EDEKKK según las instrucciones del fabricante (Pierce). Tras la unión a células HeLa en hielo (30 min.), se internaliza STxB-EDEKKK durante 45 min. a 37°C. Las células se fijan, y se tiñen de manera doble para STxB (anticuerpo 13C4) y estreptavidina para detectar biotina vectorizada. Obsérvese que la biotina vectorizada se acumula en el aparato de Golgi perinuclear.

Ejemplo 1

Validación del modelo de ratón para la administración diagnóstica y terapéutica in vivo de compuestos híbridos

El modelo murino porta un cáncer colorrectal.

Se realizaron experimentos piloto para examinar la distribución tisular de STxB a las 2,5 horas o 24 horas tras la inyección. La STxB se capta mucho en el tejido tumoral, pero no en el epitelio intestinal normal, que expresa bajos niveles de Gb₃. Dado que la STxB es no tóxica, este procedimiento puede aplicarse repetidamente para estudios longitudinales de desarrollo tumoral o regresión tumoral tras el tratamiento.

1.1: Gb₃ se sobreexpresa fuertemente en tumores intestinales: análisis de recubrimiento

Se usan tres modelos de ratón modificado genéticamente para cáncer colorrectal, y muestran esencialmente los mismos resultados en este estudio. Se usan animales transgénicos que expresan Ras oncogénico bajo el control del promotor de vilina en el epitelio intestinal, con el antecedente genético B6D2 (Tg vilina-K-ras V12G; (Janssen *et al.*, 2002) y la línea de ratón Apc^{1638N} que porta un alelo mutado heterocigótico del locus Apc (poliposis coli adenomatosa) en el antecedente C57Bl/6 (Fodde *et al.*, 1994). Además, se crea una línea transgénica doble RasAPC mediante cruzamiento de las dos líneas transgénicas. Los animales usados tenían una edad de >6 meses y un peso de 25-35 gramos en el momento de la inyección. Se mantienen los ratones bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y se alimentan con dieta convencional y agua a voluntad.

Se procesan las muestras intestinales inmediatamente tras sacrificar el animal. Se abren longitudinalmente los intestinos grueso y delgado, se diseccionan las regiones tumorales junto con el tejido normal circundante y o bien se incrustan para obtener criosecciones (véase a continuación) o bien se fijan en AFA (etanol al 75%, formalina al 20% y ácido acético al 5%) durante 24 horas. Tras incrustar, se cortan secciones de tres µm de grosor de los bloques de tejido, se desparafinan, se rehidratan y se procesan mediante tinción de H&E de rutina. Se clasifican y ordenan los tumores según la clasificación de tumores de la Organización Mundial de la Salud (Hamilton y Aaltonen, 2000). Se consideran invasivos los adenocarcinomas si se encuentran células epiteliales malignas, dispuestas en estructuras glandulares y/o trabeculares, invadiendo al menos la submucosa.

Se realiza la extracción de lípidos según el método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959). Se pesan el tejido tumoral humano y de ratón y la muestra no tumoral adyacente, se homogeneizan mecánicamente en 1 ml de tampón acuoso y se inyectan en 3,75 ml de cloroformo:metanol (1:2).

Tras mezclar, se añaden 1,25 ml de cloroformo y 1,25 ml de agua. Se separan las fases tras mezclar, y se lava una vez la fase hidroalcohólica con 1,5 ml de cloroformo. Se secan las fases de cloroformo combinadas bajo nitrógeno, y se saponifican los lípidos a 56°C durante 1 hora en 1 ml de metanol/KOH. Se extrae de nuevo una vez la reacción de saponificación tal como se describió anteriormente, y se lava la fase de cloroformo una vez con metanol:agua (1:1). Se colocan los glicolípidos neutros aislados sobre placas de CCF de alta resolución (Merck, Darmstadt, Alemania) y se separan con cloroformo:metanol:agua (65:25:4). Se empapan las placas secadas en poli(metacrilato de isobutilo) al 0,1% en hexano, se dejan flotar durante 1 hora en disolución de bloqueo, seguido por incubación con STxB (20 nM), anticuerpos anti-STxB policlonales primarios y anticuerpos anti-conejo acoplados a fosfatasa alcalina o peroxidasa del rábano secundarios. Se revelan las bandas reactivas usando quimiofluorescencia o quimioluminiscencia potenciada (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, RU) y PhosphorImager.

Se comparan los niveles de expresión de Gb₃ entre tejido normal y tumoral.

La figura 10 muestra la sobreexpresión de Gb₃ por tumores murinos y humanos.

1.2: Gb₃ se sobreexpresa fuertemente en tumores intestinales: marcaje de STxB-Cy3 en secciones de tejido

Se lleva a cabo el marcaje de STxB-Cy3 de criosecciones para detectar Gb₃ endógena en tejido tumoral e intestinal normal de animales por lo demás no tratados. Se diluye una disolución de reserva de STxB-Cy3 (0,22 mg/ml) 22 veces en PBS+ BSA al 0,2% (concentración final 10 µg/ml), y se incuba sobre secciones durante 30 min. o bien antes o bien tras la fijación con PFA a temperatura ambiente durante 20 min. Posteriormente, se tratan las secciones fijadas con paraformaldehído con NH₄Cl 50 mM en PBS durante 20 min., y se solubilizan con Triton X-100 al 0,1%

durante 5 min. Se realiza la contratinción con FITC-faloidina y colorante Hoechst tal como se describió anteriormente. El tejido normal es globalmente negativo, excepto por una débil tinción que puede observarse algunas veces en las criptas, y la tinción ocasional de células individuales dentro del tejido normal. Estas células pueden constituir células enteroendocrinas/linfáticas, basándose en criterios morfológicos. En cambio, los tumores se tiñen fuertemente.

1.3: STxB administrada por vía oral alcanza tumores intestinales *in vivo*

Se acomete un experimento piloto con un marcador de color para seguir la distribución del fluido inyectado en el intestino murino: se inyectan 0,5 ml de azul tripano. Se sacrifica el animal tras 45 min., y se extirpa el tracto intestinal y se analiza para determinar la distribución del azul tripano. La tinción azul ha avanzado claramente a través de la mayor parte del intestino delgado.

Se inyectó a dos animales STxB, usando en un animal una dosis de 0,5 ml de una disolución de 1 mg/ml (animal A), o una dosis más pequeña de 0,5 ml de una disolución de 0,1 mg/ml (animal B). Se usa una aguja de plástico flexible con una longitud de 40 mm y un diámetro de 0,4 mm (Marquat Genie Biomedical, Boissy St Leger, referencia V010440). Se purifica STxB de bacterias (Mallard y Johannes, 2002) y se dializa frente a IPBS antes de la inyección. Se inyecta a los animales en el esófago una única dosis de 0,5 ml de una disolución de concentraciones variables de STxB en PBS sin anestesia. Tras la alimentación forzada, se mantienen los animales durante diversos puntos de tiempo y se deja que se alimenten con dieta convencional y agua a voluntad.

A las 2,5 horas tras la inyección, se sacrifican los ratones mediante dislocación cervical y se extirpan los tejidos para análisis posteriores. Se toman muestras de tejidos a lo largo del tracto intestinal, así como tumores de cada animal. Se prepara el tejido tumoral y normal resecado para obtener criosecciones, o se procesa para la extracción de lípidos y los experimentos de recubrimiento posteriores, tal como se describió anteriormente. Se analizan los animales en criosecciones en serie con los anticuerpos monoclonales así como policlonales para STxB. Se cortan tejidos de ratón incrustados en Tissue-tek OCT (Sakura) en secciones en serie a un grosor de 5 μ m, se secan al aire y se fijan con paraformaldehído al 3% a temperatura ambiente durante 20 min. Se tratan las secciones fijadas con paraformaldehído con NH₄Cl 50 mM en PBS durante 20 min., y se solubilizan con Triton X-100 al 0,1% durante 5 min. Se usan anticuerpos: anticuerpos monoclonales y policlonales específicos para STxB, diluidos 1/100 (Falguières *et al.*, 2001), AcM anti-vilina ID2C3 (Dudouet *et al.*, 1987), AcP anti-Ki67 (Novocastra), antisuero policlonal anti-cromogranina A/B (Pro-Gen, Heidelberg), los anticuerpos secundarios eran IgG de cabra anti-ratón e IgG de cabra anti-conejo acoplados a Alexa488 o Cy3 (Jackson Immunoresearch), TRITC-faloidina (Sigma) para visualizar la actina, y el colorante Hoechst 33258 (Sigma) para teñir los núcleos.

Se identifican las regiones tumorales mediante criterios histológicos convencionales, y son positivos para el marcador proliferativo Ki67. Se identifican células epiteliales con un anticuerpo monoclonal anti-vilina. No puede observarse tinción de STxB en células epiteliales intestinales normales (figura 1), pero se produce una fuerte tinción en algunas células ocasionales que están intercaladas en la capa epitelial, y presentan características morfológicas de células enteroendocrinas, y se encuentra que son positivas para la tinción con cromogranina A/B, un marcador de células enteroendocrinas (figura 2). Además, se marcan algunas células que podrían ser de origen linfático (macrófagos o células dendríticas). Este patrón de tinción se encuentra en el duodeno, el yeyuno y el íleo, pero está ausente del colon. Los parches de Peyer también permanecen esencialmente sin marcar. Un adenocarcinoma periampular del animal A se marca muy fuertemente (figura 1). El marcaje comprende aproximadamente el 50% de toda el área superficial del tumor, y se encuentra en células epiteliales que revisten estructuras trabeculares o glandulares. Además, algunas veces muestran tinción regiones del estroma con signos de inflamación, las células marcadas son de supuesto origen linfóide. El estroma es por lo demás negativo. Sin embargo, dos lesiones diferentes del mismo animal son negativas, aparte de la tinción en células de supuesto origen linfóide en el estroma. El animal B recibe la dosis más débil de STxB y muestra esencialmente los mismos resultados, el tejido normal es negativo con la excepción de unas pocas células individuales. No se marca un tumor periampular, pero se marca un segundo tumor del duodeno en células tumorales de origen epitelial (tal como se prueba mediante tinción con anti-vilina). Sin embargo, la intensidad global de la tinción disminuye notablemente en comparación con el animal A (dosis de 1,0 mg/ml).

1.4: STxB se conserva en los tumores tras un periodo de incubación de 24 h

Se inyectan a dos animales 0,35 ml de una disolución de 1 mg/ml de STxB en PBS. Se sacrifican los ratones tras 24 horas. Se toman muestras de tejido de tejido control (hígado), y el tracto intestinal: duodeno, yeyuno, íleo, colon proximal. Se aíslan tumores de ambos animales, y se preparan para criosecciones, y se tiñen con Ac policlonal anti-STxB y anti-cromogranina A/B. Incluso tras 24 horas, todavía puede detectarse STxB en células ocasionales en el por lo demás epitelio negativo, y está todavía muy fuertemente presente en tumores (figura 3). No puede observarse tinción en secciones de hígado de ambos animales (figura 4).

Ejemplo 2

Diagnóstico in vivo mediante MRI

5 2.1: Síntesis y acoplamiento de porfirina (agente de contraste) a STxB-Cys

Un agente de contraste que se usa comúnmente para estudios de RMI son metaloporfirinas paramagnéticas. Para dirigir una porfirina hidrófila hacia células tumorales, se sintetiza la siguiente sustancia.

10 Se prepara la porfirina I (figura 6) mediante condensación de pirrol, para-2,3,4,6-tetraacetilglucosilobenzaldehído (Halazy *et al.*, 1990) y -bromo-para-tolualdehído (Wen *et al.*, 1997) en alto rendimiento (31%) mediante el método de Lindsey (Lindsey *et al.*, 1987). Se purifica el compuesto I mediante cromatografía en capa fina preparativa de gel de sílice eluida mediante una mezcla de cloruro de metileno/acetona (10/1, v/v) y se caracteriza por métodos físicos. Microanálisis para $C_{87}H_{85}BrN_4O_{30}$, 3 H_2O C, 58,03; H, 5,09; N, 5,09 hallado C, 58,07; H, 4,77; N, 2,74, espectro de UV-visible en cloruro de metileno χ_{max} (nm), (s $mmoles^{-1} cm^{-1}$) 419,5 (414,3), 516 (17,9), 552 (10,5), 591 (6,9), 647 (5,9), espectro de 1H RMN en $CDCl_3$ δ (ppm) 8,88 (s, 8 H, pirrol), 8,26 (d, 2 H, orto-fenilo), 8,16 (d, 6 H, orto-fenoxilo), 7,82 (d, 2 H, meta-fenilo), 7,42 (d, 6 H, meta-fenoxilo), 5,50 (m, 9 H, H “osa”), 5,33 (m, 3 H, H “osa”), 4,88 (s, 2 H, CH_2Br), 4,45 (dd, 3 H, HC_{6a} “osa”), 4,33 (d, 3 H, HC_{6a} “osa”), 4,08 (m, 3 H, HC_5 “osa”), 2,24 (s, 9 H, acetilo), 2,14 (s, 9 H, acetilo), 2,13 (s, 18 H, acetilo), -2,79 (s, 2 H, NH). Se obtiene cuantitativamente el compuesto glicoconjugado II (figura 6) a partir del I mediante tratamiento con $MeONa/MeOH$ (Zemplén, 1927). espectro de UV-visible en DMSO χ_{max} (nm), (s $mmoles^{-1} cm^{-1}$) 422 (373,7), 517,5 (16,2), 554 (11,5), 592,5 (6,7), 649 (6,6), espectro de 1H RMN en DMSO d_6 δ (ppm) 8,87 (s, 6 H, pirrol), 8,82 (s, 2 H, pirrol), 8,24 (d, 2 H, orto-fenilo, $J = 7,9$ Hz), 8,13 (d, 6 H orto-fenoxilo, $J = 7,9$ Hz), 7,89 (d, 2 H, meta-fenilo, $J = 8,3$ Hz), 7,48 (d, 6 H, meta-fenoxilo, $J = 8$ Hz), 5,7 (s, 2 H, CH_2Br), 5,23 (d, 3 H, HC_1 “osa”), 3,82 (d amplio, 3 H, HC_{6a} “ona”), 3,54 (m, 3 H, HC_{6a} “osa”), 3,42 (m, 3 H, HC_3 “osa”), -2,91 (s, 2 H, NH), espectro de ^{13}C RMN en DMSO d_6 δ (ppm) 157,4 (para-C fenoxilo), 141 (meso-C fenilo), 137 (para-C fenilo), 135,1 (meso-C y meta-C fenoxilo), 134,5 (orto-C fenilo), 131 (C-H pirrol), 127 (meta-C fenilo), 120 (meso-C) 114,3 (orto-C o meta-C fenoxilo), 100,5 (C₁ “osa”), 73,5 (C₂ “osa”), 60,7 (C₆ “osa”), 45,7 (CH_2Br), MALDI-TOF calculado; para $C_{63}H_{61}BrN_4O_{18}$ 1240,32, M + 1 hallado 1241,48.

30 Para el acoplamiento del compuesto II o II-M a STxB/Cys, se incuban 3 mg/ml de STxB/Cys en borato 10 mM pH 9,0, NaCl 75 mM, DMSO al 50% durante 2 horas a temperatura ambiente con un exceso de 5 veces de compuesto II o II-M. Se verifica el acoplamiento mediante MALDI-TOF, y se purifica la proteína acoplada mediante filtración en gel y se almacena a -80°C.

35 2.2: Acoplamiento de BSA a STxB/Cys y unión a nanopartículas (o ferrofluido; agente de contraste)

Se incuban 20 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) purificada en HEPES 100 mM, pH 7,4, con 1 mM del MBS reticulante heterobifuncional durante 30 min. a temperatura ambiente. Se hace pasar la reacción a través de una columna de filtración en gel equilibrada con PBS/EDTA 10 mM. Se concentra la BSA eluida hasta 20 mg/ml. Se mezcla 1 volumen de STxB/Cys a 3,5 mg/ml en PBS/EDTA con 1 volumen de BSA activada y se incuba durante la noche a temperatura ambiente. Se purifica el producto de acoplamiento haciéndolo pasar sobre una columna de inmunopurificación anti-STxB y una columna de intercambio aniónico MonoQ. Según el análisis de tipo Western, el producto es esencialmente puro. Se realiza la unión de STxB/Cys-BSA a nanopartículas tal como se describe (Wilhelm *et al.*, 2002).

45 2.3: Obtención de imágenes no invasiva de la distribución de Gb_3 *Principio*

50 La monitorización de la distribución Gb_3 mediante técnicas de MRI requiere la administración de un compuesto compuesto por la molécula específica de receptor, STxB, unida a un agente de contraste paramagnético apropiado (ferrofluido o porfirina). La acumulación de este agente de contraste dirigido en el sitio de fijación modifica localmente las tasas de relajación de agua R1, R2, R2* conduciendo a una modificación de señal MRI usando secuencias de obtención de imágenes ponderadas en T1 y/o T2 y/o T2*. Una diferencia de señal significativa en las imágenes obtenidas antes y después de la administración del agente de contraste representa las regiones de sobreexpresión de Gb_3 cuando no puede excluirse la acumulación no específica. Puede aplicarse el protocolo a diferentes tipos de tumor que sobreexpresan Gb_3 . Se optimiza el procedimiento de medición típico descrito a continuación en el presente documento para la obtención de imágenes de tumores intestinales desarrollados por el modelo de ratón transgénico.

60 *Adquisición de imágenes*

En primer lugar, se detectan los tumores mediante MRI en una sesión de examen sin administración de agente de contraste. Se realiza la obtención de imágenes en un minisistema de obtención de imágenes de campo alto, en este caso un sistema Bruker Biospec 47/30 equipado con un imán horizontal de 4,7 Teslas. Para esto, se anestesia el ratón (anestésico preferido: isoflurano) y se coloca en una camilla en posición supina. Se colocan tubos que contienen agua templada en circulación cerca del animal con el fin de mantener la temperatura corporal. Se introduce el animal en una sonda de MRI adaptada al tamaño del animal. La sonda preferida es una sonda de tipo cilíndrica con ranuras casera ($d = 44$ mm). También se introduce un tubo que contiene una disolución acuosa con tasas de relajación R1/R2 ajustadas

en la sonda de MRI y sirve como referencia de intensidad de señal externa. Ha de realizarse el sincronismo respiratorio con el fin de obtener imágenes de la región abdominal con el mínimo de artefactos de movimiento. Existen diversos enfoques para el sincronismo respiratorio en el ratón. El dispositivo de sincronismo de alta sensibilidad preferido es casero y se basa en una cámara inflable colocada en el abdomen del ratón y conectada a un transductor de presión que suministra la señal de sincronismo por medio de medios electrónicos apropiados al sistema de MRI. Se realiza la detección del tumor por medio de una secuencia de obtención de imágenes de eco de espín rápido ponderadas en T2 de 3D con un campo de visión que cubre normalmente el hígado y la región intestinal. En estas condiciones los tumores aparecen como regiones de hiperseñal. La resolución de la imagen es normalmente de 0,1 x 0,1 x 0,5 mm³. Se localizan los tumores con respecto a marcadores anatómicos, por ejemplo la unión del estómago con el intestino. Entonces se obtienen imágenes de los tumores con secuencias de eco de gradiente rápido ponderadas en T1 y T2*. Esto finaliza la primera sesión de obtención de imágenes.

Se realiza la segunda sesión de obtención de imágenes en el mismo ratón tras la administración del agente de contraste (administración preferida: oral). El protocolo de obtención de imágenes coincide exactamente con el de la primera sesión de obtención de imágenes.

Análisis de imágenes

Las regiones de interés (ROI) que cubren los tumores se definen en cortes colocalizados a partir de dos sesiones de obtención de imágenes. Se miden las intensidades medias de las ROI y se normalizan con respecto a la intensidad de la referencia externa. La intensidad de señal significativamente diferente detectada en tumores tras la administración del agente de contraste demuestra por tanto la sobreexpresión de Gb3.

2.4 Experimento de RMI adicional

Se realiza la MRI en sedimentos de células HeLa (aproximadamente 50 x 10⁶ células/sedimento) obtenidas tras la incubación con agentes de contraste a base de nanopartículas de óxido de hierro (nanopartículas, NP) y posterior centrifugación en tubos Eppendorf. Más precisamente, la preparación de la muestra de células comprendió las siguientes etapas principales: 1. Incubación de las células y NP a 4°C durante 30 min. (unión); 2. lavado (3 veces); 3. incubación a 37°C durante 2 horas (endocitosis); 4. lavado (3 veces); 6. centrifugación. Se usaron cuatro condiciones diferentes: 1. Incubación con nanopartículas de óxido de hierro (NP) no tratadas; 2. incubación con nanopartículas recubiertas con BSA (NP-BSA); 3. incubación con el agente de contraste dirigido, es decir NP-BSA unido a STxB (STxB-Cys-MBS-BSA-NP); 4. la misma condición que (3.) con células tratadas con PPMP para reducir la expresión de Gb₃.

Para la obtención de imágenes mediante MR a 4,7 Teslas, se pusieron muestras de células en un soporte de muestras que permite la obtención de imágenes simultánea de las cuatro muestras. Se realizó una medición cuantitativa del tiempo de relajación T2 (= inverso de la tasa de relajación R2) usando una secuencia de MRI multieco de cortes individuales (10 ecos, tiempos de eco que oscilan desde 4,5 ms hasta 45 ms).

Se ilustran los resultados en la figura 15.

Ejemplo 3

Obtención de imágenes de tumores usando microscopía multifotónica

Método

Se colocan muestras de tejido tumoral resecado a partir de ratones villin-RasV12 directamente en una cámara de obtención de imágenes que contiene medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin rojo de fenol. Se usó un microscopio Olympus invertido IX70. Un láser de Ti:Zafiro pulsado sintonizable (Tsunami; Spectra Physics) bombeado por un láser Nd-YVO4 (Millennia, Spectra Physics) proporciona 70 pulsos fs a 750 nm con una repetición de 80 MHz. Se detecta la fluorescencia con el fotomultiplicador Fluoview incorporado (R928, Hamamatsu Photonics) en la configuración sin barrido.

Puede usarse STxB funcionalizada para seleccionar como diana e identificar tumores intestinales mediante enfoques de obtención de imágenes exhaustivos no invasivos. El fluoróforo Cy3, cuando se acopla a STxB, se acumula fuertemente en tumores intestinales, demostrando que STxB suministra agentes de contraste para el diagnóstico *in vivo* a tumores que expresan Gb3. Se mostró esto usando la capacidad de biopsia óptica de la obtención de imágenes multifotónicas. Lo primero de todo, se observan vellosidades del duodeno de tejido resecado canceroso o normal sin fijación o tinción anterior, usando autofluorescencia no lineal (figura 11 A-C). La alineación regular de los núcleos (zonas oscuras) en las células epiteliales es claramente visible (figura 11 B). En cambio, los núcleos aparecen escalonados y alargados en la muestra de tumor desdiferenciado (figura 11 C). Entonces se alimentan de manera forzada ratones transgénicos con STxB acoplada a fluoróforo. Tras 6 horas, se secan muestras tumorales así como muestras de mucosa normal y se observan mediante obtención de imágenes multifotónicas. El tejido normal aparece oscuro, mientras que el tejido tumoral está marcado intensamente con el STxB internalizada (figura 11 D-E).

Se ilustran los resultados en la figura 11.

Ejemplo 4

*Tratamiento del tumor mediante fototerapia dinámica*5 *Método*

Se disuelve la glicoporfirina H2TPP(p-O-K-□-GluOAc)3(p-CH2Br) en DMSO a 0,7 mM y se mezcla con un volumen igual de STxB-Cys a 5,3 mg/ml. Se incuba la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente y entonces se hace pasar a través de una columna de filtración en gel G25. El producto de acoplamiento se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se mantiene a -80°C para almacenamiento.

Se cultivan células tumorales humanas (o bien carcinoma de colon HT29 o bien adenocarcinoma de cuello uterino Hela) en MEM de Dulbecco complementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS). Se siembran células del cultivo en fase logarítmica en microplacas de 96 pocillos (0,2 ml-3 x 10⁴ células/pocillo) y se mantienen a 37°C en una incubadora con camisa exterior de agua durante 3 horas bajo una atmósfera de aire/CO₂ (5% de CO₂). Se añaden los compuestos sometidos a prueba en el volumen mínimo. Se incuban las placas durante 3 horas, entonces se elimina el medio y se lavan las células dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes de la adición de medio nuevo libre de fármaco. Se realiza irradiación con luz visible (2 J/cm²) a través del fondo de las placas usando una “caja de luz” casera equipada con un filtro naranja (0% de T a 520 nm y 80% de T a 590 nm y superior) conduciendo a una fluencia de 2 mW/cm². Se incuban las placas durante tres días antes de la evaluación de la supervivencia celular usando el ensayo MTT (Mosmann, 1983) usando 30 min. de incubación con 10 µg/pocillo de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma). Tras la eliminación del medio, se recogen los cristales de formazán con 100 µl de DMSO y se mide la absorbancia a 540 nm con un lector de microplacas de Bio-Rad (Modelo 450). Se expresa la supervivencia como % de controles no tratados.

La comparación entre el tratamiento con porfirina libre o con conjugado STxB-porfirina o bien en células HeLa-Gb3⁺, células HT29 (con baja expresión de Gb₃) o bien células HeLa con expresión de Gb₃ totalmente inhibida permite verificar el direccionamiento de colorante específico mediante STxB.

Se ilustran los resultados en la figura 12.

Ejemplo 5

35 *Tratamiento del tumor mediante neocarzinostatina*a) *Purificación de neocarzinostatina*

Se adquiere holo-NCS de Nippon Kayaku Co. (Tokio, Japón) y se purifica tal como se describe (Favaudon, 1983). Se dializa la holo-NCS purificada frente a agua destilada acidificada con ácido acético 1 mM, se liofiliza hasta sequedad y se almacena en la oscuridad a -80°C.

La preparación de holo-NCS es ≥ 98% pura a partir del isoelectroenfoque (gradiente de pH 2,5-4,5) en gel de poli-acrilamida y está libre de apo-NCS contaminante a partir de la espectroscopia de fluorescencia y absorción. NCS_{Chrom} está en su mayoría (> 90%) en la forma “A” según la nomenclatura de Napier *et al.* (Napier *et al.*, 1981).

Se titulan las disoluciones de holo-NCS mediante espectrofotometría de absorción usando los coeficientes de extinción molar, concretamente, $\epsilon_{277} = 14,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para apo-NCS y, para holo-NCS, $\epsilon_{273} = 35,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{340} = 10,9 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

50 b) *Acoplamiento de apo-NCS a STxB-Cys*

Se incuban 20 mg/ml de apo-NCS purificada en HEPES 100 mM, pH 7,4, con 1 mM del MBS reticulante hetero-bifuncional durante 30 min. a temperatura ambiente. Se hace pasar la reacción a través de una columna de filtración en gel equilibrada con PBS que contiene EDTA 10 mM. Se concentra la apo-NCS activada eluida hasta 20 mg/ml. Se mezcla un volumen de STxB/Cys a 3,5 mg/ml en PBS/EDTA con 1 volumen de apo-NCS activada y se incuba durante la noche a temperatura ambiente. Se purifica el producto de acoplamiento haciéndolo pasar sobre una columna de inmunopurificación anti-STxB y una columna de filtración en gel. Según el análisis de tipo Western, el producto de acoplamiento, denominado apo-NCS/STxB, es esencialmente puro.

60 c) *Incorporación de NCS_{Chrom} en el conjugado apo-NCS/STxB*

Se suspende 1 µmol de polvo de holo-NCS liofilizado (11,3 mg de peso seco) en 1 ml de metanol anhidro, enfriado con hielo acidificado con HCl 1 N, y se incuba durante 10 min. con agitación con vórtex cada 2 min. seguido por centrifugación (10 min. a 11.000 g). Se recoge la fracción sobrenadante que contiene NCS_{Chrom} libre y se titula mediante espectrometría de absorción tal como se describe (Favaudon, 1983). Se realiza todo el procedimiento a la temperatura del hielo en la oscuridad. El rendimiento de la extracción de NCS_{Chrom} es próximo al 50%.

Se enfrían seis nmoles del conjugado apo-NCS/STxB en 1 ml de tampón PBS, pH 7,4 en hielo y se mezclan con agitación con vórtex con un exceso molar de 10 veces de NCS_{Chrom} de la preparación anterior. Se forma un precipitado, probablemente debido al pH ácido o a la baja solubilidad de la NCS_{Chrom} libre en medio acuoso. Se centrifuga la preparación (10 min., 11.000 g). Se carga la fracción sobrenadante en una columna de 1,0 x 20 cm de Sephadex G-25 equilibrada con tampón fosfato 20 mM, pH 6,4. Se redisuelve el sedimento en 500 µl del mismo tampón, y se junta en la columna con la primera fracción sobrenadante. Se realiza la elución en tampón fosfato 20 mM, pH 6,4. Se realizan todas las operaciones en la oscuridad a 4°C. Se comprueban las fracciones recogidas mediante espectrofotometría de absorción; las fracciones que contienen proteína (detectadas mediante un absorbancia a 280 nm) presentan una banda de absorción centrada a 340 nm, típica de NCS_{Chrom} unida a proteína (figura 7).

Se juntan las fracciones de proteína, se concentran mediante centrifugación sobre una unidad de filtro centrífugo Centricon® (punto de corte de 3.000 Da), se esterilizan mediante filtración sobre una unidad Millex® (tamaño de poro de 0,2 µm) y se almacenan en la oscuridad a temperatura de nitrógeno líquido (para almacenamiento prolongado se recomienda bajar el pH hasta pH 5,0). La concentración final del holo-NCS/STxB reconstituido es de 9,8 µM con respecto a la absorción de NCS_{Chrom} unida a proteína a 340 nm.

d) Ensayos de citotoxicidad

Se mantienen células de adenocarcinoma de cuello uterino humano HeLa como monocapas de crecimiento exponencial en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco con glucosa 4,5 g/l, piruvato 0,1 g/l, penicilina 10⁵ UI/l, estreptomycin 0,1 g/l, Glutamax I 0,86 g/l y suero de ternera fetal al 10% v/v (37°C, 5% de CO₂), sin o con DL-treo-1-fenil-2-hexadecanoil-amino-3-morfolino-1-propanol (PPMP) 5 µM para inhibir la expresión de Gb₃. Cuando está presente, se introduce PPMP en los precultivos durante al menos 6 días antes de los ensayos de citotoxicidad y está presente hasta el lavado del fármaco.

Se realizan los ensayos de citotoxicidad en paralelo usando células HeLa subcultivadas con o sin PPMP. En resumen, se siembran las células a una densidad de 800 células (matraces de 25 cm²) y se incuban durante 4 horas antes del tratamiento para permitir la adhesión y extensión. Se tiene cuidado para evitar la contaminación de suspensiones de células semilla en grupos, puesto que su presencia introduce errores mayores en la medición de la clonogenicidad.

Para la determinación de la citotoxicidad de holo-NCS u holo-NCS/STxB, se descongelan alícuotas estériles de fármaco inmediatamente antes de su uso, se ajusta a la concentración adecuada en PBS pH 6,0 e inmediatamente se introducen en los matraces de cultivo. Se llevan a cabo todos los experimentos en luz tenue para prevenir la fotodescomposición de los fármacos.

Los inventores observan que el efecto citotóxico completo de holo-NCS se desarrolla en 6 min. de incubación solamente (37°C), y el aumento de la duración del contacto con el fármaco más allá de ese tiempo no da como resultado un aumento de la destrucción celular. Por esta razón se limitó la duración de la exposición al fármaco a 15 min. desde el principio hasta el fin.

Tras el tratamiento, se lavan los matraces dos veces con solución salina equilibrada de Hank, se suministra medio nuevo y se devuelven a la incubadora durante 8 días. Entonces se fijan las colonias con metanol, se tiñen y se puntúan.

e) Citotoxicidad frente a células HeLa

En primer lugar se verifica que la citotoxicidad de holo-NCS permanece sin cambios tras su acoplamiento a STxB/Cys. Usando holo-NCS y holo-NCS/STxB, la concentración de fármaco que destruye el 50% de la población celular, es de 0,71 ± 0,05 nM. Entonces se investiga la citotoxicidad de holo-NCS y holo-NCS/STxB a 0°C sin y con PPMP, usando una concentración letal de NCS (4 nM). La base de este experimento es que se sabe que holo-NCS es inactiva a baja temperatura (Kappen *et al.*, 1980) mientras que STxB todavía puede unirse y saturar su receptor en estas condiciones (Johannes *et al.*, 1997), y se espera que se internalice tras el calentamiento.

Se enfrían las células sembradas en matraces en hielo durante 15 min. antes de su exposición a holo-NCS u holo-NCS/STxB. Entonces se introducen los fármacos (4 nM) y se incuban durante otros 15 min. en hielo. En ese momento, se elimina el medio mediante aspiración, y se aclaran cuidadosamente los matraces dos veces con solución salina equilibrada de Hank enfriada con hielo para eliminar los fármacos. Finalmente, se suministra a los matraces medio libre de fármaco enfriado con hielo y se permite que vuelvan a equilibrarse a temperatura ambiente, entonces se incuban a 37°C durante 8 días. Se preparan blancos para comprobar que no se introduce toxicidad enfriando las células durante la duración del experimento. Se muestran los resultados en la figura 8.

La supervivencia a holo-NCS está en el intervalo del 90% o más. Por tanto, una baja temperatura efectivamente suprime la citotoxicidad de holo-NCS. En cambio, el holo-NCS/STxB todavía es activo a 0°C, de manera que la supervivencia celular es de aproximadamente el 30% solamente. El PPMP indujo resistencia notable a holo-NCS/STxB.

En general, el experimento muestra que STxB puede llevar a cabo la incorporación del fármaco en células en condiciones que limitan la captación del fármaco por otras rutas. Puesto que el número de sitios de receptor de STxB en la superficie celular es limitado, se sugiere que el método funcionará específicamente con fármacos que actúan en el intervalo nanomolar.

En este estudio se expande el uso de STxB como vector para seleccionar como diana específicamente células tumorales, y se somete a prueba con éxito el direccionamiento en modelos de ratón para cáncer colorrectal. Se muestra que puede administrarse STxB por vía oral a ratones, en los que alcanza los tumores intestinales en 2,5 horas, y muestra fuerte concentración en tejido tumoral en comparación con tejido control (hígado) y tejido intestinal normal. Además, se conserva STxB en los tumores incluso tras un periodo de incubación de 24 h. La STxB funcionalizada es una herramienta valiosa para someter a prueba enfoques terapéuticos y diagnósticos novedosos. Se usa para estudiar acontecimientos tempranos en la formación de tumores en el intestino, que se ha comprobado que es difícil de visualizar con otras técnicas. Se emprendieron estudios de RMI antes y después de la aplicación de un agente de contraste unido a STxB con el fin de distinguir mejor el tumor de su tejido circundante. Además, se ejecutan estudios longitudinales basados en técnicas de obtención de imágenes no invasivas con este agente funcionalizado. Finalmente, los agentes de contraste usados en tumores humanos que se inyectan por vía ortotópica en el intestino ciego de ratones atímicos inmunocomprometidos.

Además, se preparan composiciones novedosas usando STxB como vehículo que permite el direccionamiento de compuestos terapéuticos hacia tumores que expresan Gb3. Se ha demostrado el efecto de estas composiciones en células tumorales *in vitro*, en tumores en los modelos animales descritos y en tumores humanos.

Ejemplo 6

Administración de enzimas para la activación de profármacos

Acoplamiento químico de β -Glucuronidasa a STxB-Cys. Se hacen reaccionar 3 mg/ml de β -glucuronidasa (β -GUS) purificada en HEPES 100 mM, pH 7,4 con 90 μ M del MBS reticulante heterobifuncional durante 30 min. a temperatura ambiente. Se separa el MBS que no reaccionó del complejo β -GUS-MBS formado mediante filtración en gel a través de una columna PD-10 equilibrada con PBS-EDTA 10 mM. Entonces se concentra la β -GUS activada hasta 2 mg/ml, se mezcla con un exceso molar de 35 de STxB-Cys y se incuba durante la noche a temperatura ambiente. Se purifica el complejo STxB-Cys- β -GUS formado haciéndolo pasar sobre una columna de filtración en gel y una columna de inmunoafinidad anti-STxB. El producto de acoplamiento purificado es sumamente puro, tal como se somete a prueba mediante inmunotransferencia de tipo Western, y la actividad de la enzima no se altera mediante las modificaciones químicas.

Direccionamiento celular de STxB-Cys acoplado a β -glucuronidasa. Se estudian las propiedades de tráfico de STxB-Cys- β -GUS en células Hela, en comparación con β -GUS y STxB-Cys. Se incuban células Hela ($0,75 \times 10^5$), que se hicieron crecer sobre cubreobjetos de vidrio, con 0,5 μ M de STxB-Cys, β -GUS o β -GUS-STxB-Cys durante 30 min. a 4°C (etapa de unión). Entonces se lavan las células con medio de cultivo enfriado con hielo, se cambian a 37°C durante 40 min. (etapa de internalización), se fijan con PFA al 4% durante 10 min., se permeabilizan con saponina, se tiñen con los anticuerpos primario y secundario indicados y se analizan mediante microscopia confocal. Se ilustran los resultados obtenidos en la figura 13.

Los experimentos de microscopia confocal muestran un recubrimiento perfecto del marcaje obtenido con los anticuerpos dirigidos frente a STxB y β -GUS (figura 13). No se observó tinción celular en el caso de β -GUS no vectorizado (datos no mostrados). Estos resultados demuestran claramente el direccionamiento de β -glucuronidasa en la ruta de transporte retrógrado, usando STxB para la vectorización.

Se ilustran los resultados en la figura 13.

Actividad β -glucuronidasa vectorizada asociada a células. Se sometió a prueba si la vectorización de β -GUS mediante STxB-Cys da como resultado un aumento en la actividad enzimática celular en células Hela que expresan o no el receptor Gb3 de la toxina Shiga. Se realiza el ensayo enzimático de β -GUS en presencia de 4-metilumbeliferilglucuronido, que tras su hidrólisis mediante β -GUS produce 4-metilumbeliferona (4-MU), fluorescente cuya actividad fluorescente se mide mediante fluorimetría.

Se incuban células Hela (10^6) durante 30 min. a 4°C en presencia o ausencia de STxB-Cys- β -GUS 0,5 μ M (etapa de unión). Tras el lavado con medio de cultivo, se cambian las células a 37°C durante 60 min. (etapa de internalización). Se preparan lisados celulares en tampón RIPA (PBS 1X, NP40 al 1%, Doc al 0,5%, SDS al 0,5%). Se resumen en la figura 14 la actividad β -GUS celular basal y la actividad β -GUS asociada a células Hela que expresan y que no expresan Gb3, tratadas con β -GUS-STxB. Las células HeLa que expresan Gb3 muestran un aumento significativo de la actividad β -GUS en comparación con células que no expresan. Estas últimas presentan el mismo nivel de actividad β -glucuronidasa que las células control (actividad basal), indicando que el direccionamiento celular de la actividad β -GUS es dependiente del sistema STxB/Gb3.

Tomados juntos, los datos demuestran que este enfoque, basado en el acoplamiento químico de β -GUS a STxB-Cys, no altera la actividad enzimática de β -GUS y es apropiado para dirigir la enzima activa para estrategias de profármaco.

Se ilustran los resultados en la figura 14.

Ejemplo 7

Métodos de acoplamiento alternativos

Alternativas al acoplamiento por medio de grupos sulfhidrilo (-SH) son el acoplamiento por medio de grupos amino (-NH₂), hidratos de carbono, carboxilos (-COOH) o hidroxilos (-OH). Ejemplos de grupos reactivos en los compuestos que van a vectorizarse son imidoésteres (reaccionan en aminas primarias), ésteres de N-hidroxisuccinimida (reaccionan en aminas primarias), maleimidas (reaccionan en sulfhidrilos), haloacetilos (reaccionan en sulfhidrilos), hidrazinas (reaccionan en hidratos de carbono oxidados), carbodiimidas (reaccionan en carboxilos).

La STxB de tipo natural no está glicosilada. Puede obtenerse STxB glicosilada para acoplamiento químico expresando una variante que porta un sitio de glicosilación de STxB en células competentes para glicosilación, tales como la levadura *Pichia pastoris*. Están presentes grupos amino, carboxilatos e hidroxilos en STxB de tipo natural, y el acoplamiento químico da como resultado mezclas heterogéneas que contienen proteína inactivada. Para obtener algún grado de acoplamiento de sitio dirigido, se fusionan aminoácidos con cadenas laterales apropiadas al extremo carboxilo terminal de STxB. En un ejemplo, se fusiona la secuencia de aminoácidos EDEKKK (Glu-Asp-Glu-Lys-Lys-Lys) al extremo carboxilo terminal de STxB de tipo natural. La reacción con biotina activada con éster de N-hidroxisuccinimida permite introducir biotina en STxB-EDEKKK sin inactivar la proteína, tal como se muestra a modo de ejemplo en la figura 16 en la que puede detectarse biotina vectorizada con STxB en el aparato de Golgi de células HeLa.

Se ilustran los resultados en la figura 16.

Bibliografía

Arab, S., E. Russel, W.B. Chapman, B. Rosen, y C.A. Lingwood. 1997. Expression of the verotoxin receptor glycolipid, globotriaosylceramida, in ovarian hyperplasias. *Oncol. Res.* 9:553-563.

Arab, S., J. Rutka, y C. Lingwood. 1999. Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term elimination of human astrocytoma xenografts in nude mice. *Oncol. Res.* 11:33-39.

Babilon, R.W., K.J. Soprano, y E.E. Henderson. 1985. Hypersensitivity and reduced inhibition of DNA synthesis in ataxia telangiectasia lymphoblasts treated with low levels of neocarzinostatin. *Mutat. Res.* 146:79-87.

Bakina, E., y D. Farquhar. 1999. Intensely cytotoxic anthracycline prodrugs: galactosides. *Anticancer Drug Des.* 14:507-515.

Bligh, E.G., y W.J. Dyer. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophys.* 37:911-917.

Carlsson, J., H. Drevin, and R. Axen. 1978. Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, a new heterobifunctional reagent. *Biochem. J.* 173:723-737.

Clement B et al. 1997, **Lomb R, y Möller W** (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 19615-19620.

Dudouet, B., S. Robine, C. Huet, C. Sahuquillo-Merino, L. Blair, E. Coudrier, y D. Louvard. 1987. Changes in villin synthesis and subcellular distribution during intestinal differentiation of HT29-18 clones. *J. Cell Biol.* 105: 359-369.

Falguières, T., F. Mallard, C. Baron, D. Hanau, C. Lingwood, B. Goud, J. Salamero, y L. Johannes. 2001. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent resistant membranes. *Mol. Biol. Cell.* 12: 2453-2468.

Favaudon, V. 1982. On the mechanism of reductive activation in the mode of action of some anticancer drugs. *Biochimie.* 64:457-475.

Favaudon, V. 1983. Gamma-radiolysis study of the reductive activation of neocarzinostatin by the carboxyl radical. *Biochimie.* 65:593-607.

Fodde, R., W. Edelmann, K. Yang, C. van Leeuwen, C. Carlson, B. Renault, C. Breukel, E. Alt, M. Lipkin, P.M. Khan, y et al. 1994. A targeted chain-termination mutation in the mouse Apc gene results in multiple intestinal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:8969-8973.

Gordon, J., H. Mellstedt, P. Aman, P. Biberfeld, M. Bjorkholm, y G. Klein. 1983. Phenotypes in chronic B-lymphocytic leukemia probed by monoclonal antibodies and immunoglobulin secretion studies: identification of stages of maturation arrest and the relation to clinical findings. *Blood.* 62:910-917.

Halazy, S., V. Berges, A. Ehrhard, y C. Danzin. 1990. *Biorg. Chem.* 18:330.

Hamilton, S.R., y **L.A. Aaltonen**. 2000. WHO classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of the digestive system. Lyon: *IARC Press*.

Helbig, R., **M.Z. Zdzienicka**, y **G. Speit**. 1995. The effect of defective DNA double-strand break repair on mutations and chromosome aberrations in the Chinese hamster cell mutant XR-V15B. *Radiat. Res.* 143:151-157.

Janssen, K.P., **F. El Marjou**, **D. Pinto**, **X. Sastre**, **D. Rouillard**, **C. Fouquet**, **T. Soussi**, **D. Louvard**, y **S. Robine**. 2002. Targeted expression of oncogenic K-ras in intestinal epithelium causes spontaneous tumorigenesis in mice. *Gastroenterology*, 123:492-504.

Johannes, L. 2002. The Shiga toxin B-subunit system: Retrograde transport, intracellular vectorization, and more... *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 283:G1-G7.

Johannes, L., **D. Tenza**, **C. Antony**, y **B. Goud**. 1997. Retrograde transport of KDEL-bearing B-fragment of Shiga toxin. *J. Biol. Chem.* 272:19554-19561.

Jones, N.L., **A. Islur**, **R. Haq**, **M. Mascarenhas**, **M.A. Karmali**, **M.H. Perdue**, **B.W. Zanke**, y **P.M. Sherman**. 2000. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 278:G811-G819.

Kalisiak, A., **J.G. Minniti**, **E. Oosterwijk**, **L.J. Old**, y **D.A. Scheinberg**. 1991. Neutral glycosphingolipid expression in B-cell neoplasms. *Int. J. Cancer.* 49:837-845.

LaCasse, E.C., **M.R. Bray**, **B. Patterson**, **W.M. Lim**, **S. Perampalam**, **L.G. Radvanyi**, **A. Keating**, **A.K. Stewart**, **R. Buckstein**, **J.S. Sandhu**, **N. Miller**, **D. Banerjee**, **D. Singh**, **A.R. Belch**, **L.M. Pilarski**, y **J. Gariepy**. 1999. Shiga-like toxin-1 receptor on human breast cancer, lymphoma, and myeloma and absence from CD34(+) hematopoietic stem cells: implications for ex vivo tumor purging and autologous stem cell transplantation. *Blood.* 94:2901-2910.

LaCasse, E.C., **M.T. Saleh**, **B. Patterson**, **M.D. Minden**, y **J. Gariepy**. 1996. Shiga-like toxin purges human lymphoma from bone marrow of severe combined immunodeficient mice. *Blood.* 88:1561-1567.

Lindsey, J.S., **I.C. Schreiman**, **H.C. Hsu**, **P.C. Kearney**, y **A.M. Marguerettaz**. 1987. Rothmund and Adler-Longo reactions revisited: Synthesis of tetraphenylporfirins under equilibrium conditions. *J. Org. Chem.* 52:827-836.

Lingwood, C.A. 1996. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol.* 4:147-153.

Mallard, F., y **L. Johannes**. 2002. Shiga toxin B-subunit as a tool to study retrograde transport. En: *Methods Mol. Med. Shiga Toxin Methods and Protocols* (editado por: D Philpott y F Ebel), vol. 73, capítulo 17:209-220.

Mallard, F., **D. Tenza**, **C. Antony**, **J. Salamero**, **B. Goud**, y **L. Johannes**. 1998. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of Shiga toxin B-fragment transport. *J. Cell Biol.* 143: 973-990.

Mangeney, M., **Y. Richard**, **D. Coulaud**, **T. Tursz**, y **J. Wiels**. 1991. CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 21:1131-1140.

Momenteau, M., **P. Maillard**, **M.-A. de Bélinay**, **D. Carrez**, y **A. Croisy**. 1999. Tetrapyrrolic glycosylated macrocycles for an application in PDT. *J. Biomed Optics.* 4:1-20.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65:55-63.

Muller, C., y **B. Salles**. 1997. Regulation of DNA-dependent protein kinase activity in leukemic cells. *Oncogene.* 15:2343-2348.

Murray, L.J., **J.A. Habeshaw**, **J. Wiels**, y **M.F. Greaves**. 1985. Expression of Burkitt lymphoma-associated antigen (defined by the monoclonal antibody 38.13) on both normal and malignant germinal-centre B cells. *Int. J. Cancer.* 36:561-565.

Napier, M.A., **B. Holmquist**, **D.J. Strydom**, y **I.H. Goldberg**. 1981. Neocarzinostatin chromophore: purification of the major active form and characterization of its spectral and biological properties. *Biochemistry.* 20:5602-5608.

Ohtsuki, K., y **N. Ishida**. 1975. Neocarzinostatin-induced breakdown of deoxyribonucleic acid in HeLa-S3 cells. *J. Antibiot. (Tokyo).* 28:143-148.

Oosterwijk, E., **A. Kalisiak**, **J.C. Wakka**, **D.A. Scheinberg**, y **L.J. Old**. 1991. Monoclonal antibodies against Gal alpha 1-4Gal beta 1-4Glc (Pk, CD77) produced with a synthetic glycoconjugate as immunogen: reactivity with carbohydrates, with fresh frozen human tissues and hematopoietic tumors. *Int. J. Cancer.* 48:848-854.

Povirk, L.F. 1996. DNA damage and mutagenesis by radiomimetic DNA-cleaving agents: bleomycin, neocarzinostatin and other enediynes. *Mutat. Res.* 355:71-89.

Ramegowda, B., y V.L. Tesh. 1996. Differentiation-associated toxin receptor modulation, cytokine production, and sensitivity to Shiga-like toxins in human monocytes and monocytic cell lines. *Infect. Immun.* 64:1173-1180.

Sandvig, K., O. Garred, K. Prydz, J.V. Kozlov, S.H. Hansen, y B. van Deurs. 1992. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature.* 358:510-512.

Sandvig, K., y B. van Deurs. 1996. Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol. Rev.* 76:949-966.

Saxon, E., y C.R. Bertozzi. 2000. Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. *Science.* 287: 2007-2010.

Schelté P. et al. "Differential Reactivity of Maleimide and Bromoacetyl functions with Thiols: Application to the Preparation of Liposomal Diepitope Constructs". *Eur. J. Immunol.* (1999) 29: 2297-2308.

Shiloh, Y., E. Tabor, y Y. Becker. 1982. Cellular hypersensitivity to neocarzinostatin in ataxia-telangiectasia skin fibroblasts. *Cancer Res.* 42:2247-2249;

Singhal S. y Kaiserv L.R. (1998) Cancer chemotherapy using suicide genes. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* 7: 505-536.

Tatsumi, K., y H. Nishioka. 1977. Effect of DNA Repair systems on antibacterial and mutagenic activity of an antitumor protein, neocarzinostatin. *Mutat. Res.* 48:195-203.

Wen, L., M. Li, y J.B. Schienoff. 1997. Polyporphyrin thin films from interfacial polymerization of mercaptoporphyrins. *J. Amer. Chem. Soc.* 119:7726-7733.

Wilhelm, C., F. Gazeau, J. Roger, J.N. Pons, M.F. Salis, R. Perzynski, y J.C. Bacri. 2002. Binding of biological effectors on magnetic nanoparticles measured by a magnetically induced transient birefringence experiment. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 65:031404.

Zemplén, G. 1927. Abbau der reduzierenden biosen. *Ber. Disch. Chem. Ges.*:1555-1564.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto híbrido para la fabricación de una composición útil para el diagnóstico o el tratamiento de células tumorales intestinales que sobreexpresan el receptor Gb₃, en el que dicho compuesto híbrido tiene la siguiente fórmula: STxB-Z(n)-Cys-Y(m)-T en la que

- STxB es la subunidad B de la toxina Shiga,
- Z(n) en el que n es 0 ó 1 y cuando n es 1, Z es un residuo de aminoácido que carece de grupo sulfhidrilo, o es un polipéptido,
- Cys es el residuo de aminoácido para la cisteína,
- T es una molécula unida mediante un enlace covalente a la parte de S de la Cys, seleccionado de un grupo que comprende:
 - agentes para el diagnóstico *in vivo*,
 - agentes citotóxicos,
 - profármacos, o
 - enzimas para la conversión de un profármaco en un fármaco,
- Y(m) en el que m es 0 ó 1 y cuando m es 1, Y es un ligador entre T y Cys, siendo dicho ligador o bien escindible o bien no escindible para la liberación de T tras la internalización del compuesto híbrido en dichas células.

2. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 1, en el que n = 0.

3. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 1 ó 2, en el que T es un agente de contraste para MRI seleccionado de un grupo que comprende compuestos paramagnéticos, tales como porfirin-gadolinio, porfirin-manganeso, polímero sintético de gadolinio, ácido gadolinio-etoxibencil-dietilentriaminapentaacético, DOPTA-gadolinio, ferrofluido y nanopartículas.

4. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 1 ó 2, en el que m = 1 y T se selecciona de un grupo que comprende fármacos citotóxicos tales como antraciclinas (daunomicina, doxorubicina, daunorubicina), idarubicina, cis-platino, mitomicina C, desacetilvinblastina, metotrexato, N-acetilmelfalán, 5-fluorouracilo, mostazas de nitrógeno, caliqueamicina, maitansinoides, conjugados con un ligador sensible a enzimas;

- análogos de nucleótidos que pueden detener la replicación del ADN tales como ganciclovir o aciclovir,
- amidoximas.

5. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 1, en el que el ligador Y es un ligador escindible enzimáticamente seleccionado de un grupo que comprende folatos reducidos y no reducidos escindibles mediante carboxipeptidasa G, grupos fosfato de profármacos fosforilados escindibles mediante fosfatasa alcalina, compuestos escindibles hidrolíticamente mediante carboxipeptidasa A, nitrorreductasa para la activación de profármacos, hidrólisis de un anillo de lactama escindible mediante beta-lactamasa, amida escindible mediante penicilina amidasa, citosina desamidasa para la activación de profármacos, ácido glucurónico escindible mediante beta-glucuronidasa, galactosa escindible mediante galactosidasa, manosa escindible mediante manosidasa.

6. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 4, en el que la enzima es endógena en la célula que sobreexpresa Gb₃ o se internaliza con un segundo compuesto híbrido según la reivindicación 1 en el que T es dicha enzima.

7. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 1, en el que T es una enzima seleccionada de un grupo que contiene peptidasas, timidina cinasa de VHS₁, lipasas, glicosidasas.

8. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 1, en el que T es un fármaco fotosensibilizador para fototerapias dinámicas.

9. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 8, en el que el fármaco se selecciona de un grupo que comprende Photoform®, forean®, macrociclo tetrapirrólico glicoconjugado tal como porfirina.

ES 2 330 429 T3

10. Uso de un compuesto híbrido según la reivindicación 1, en el que T es holo-neocarzinostatina.

11. Uso de un primer compuesto híbrido según la reivindicación 1, en el que T es un profármaco, y de un segundo
5 componente para transformar el profármaco en un fármaco tóxico, para la fabricación de una composición útil para el
tratamiento de células tumorales intestinales que sobreexpresan el receptor Gb₃.

12. Uso según la reivindicación 11, en el que el segundo componente es un compuesto híbrido según la reivindica-
ción 1, en el que T es una enzima para transformar dicho profármaco en un fármaco tóxico.

10 13. Uso según la reivindicación 11 ó 12, en el que los dos compuestos se administran simultánea o secuencialmente.

14. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en el que dichas células tumorales intestinales son
células tumorales colorrectales.

15 15. Compuesto híbrido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, 14, para su uso en el diagnóstico o el
tratamiento de células tumorales intestinales que sobreexpresan el receptor Gb₃.

16. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 11-14, que comprende un primer compuesto híbrido
según la reivindicación 1, en el que T es un profármaco, y un segundo componente para transformar el profármaco en
20 un fármaco tóxico, para su uso en el tratamiento de células tumorales intestinales que sobreexpresan el receptor Gb₃.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

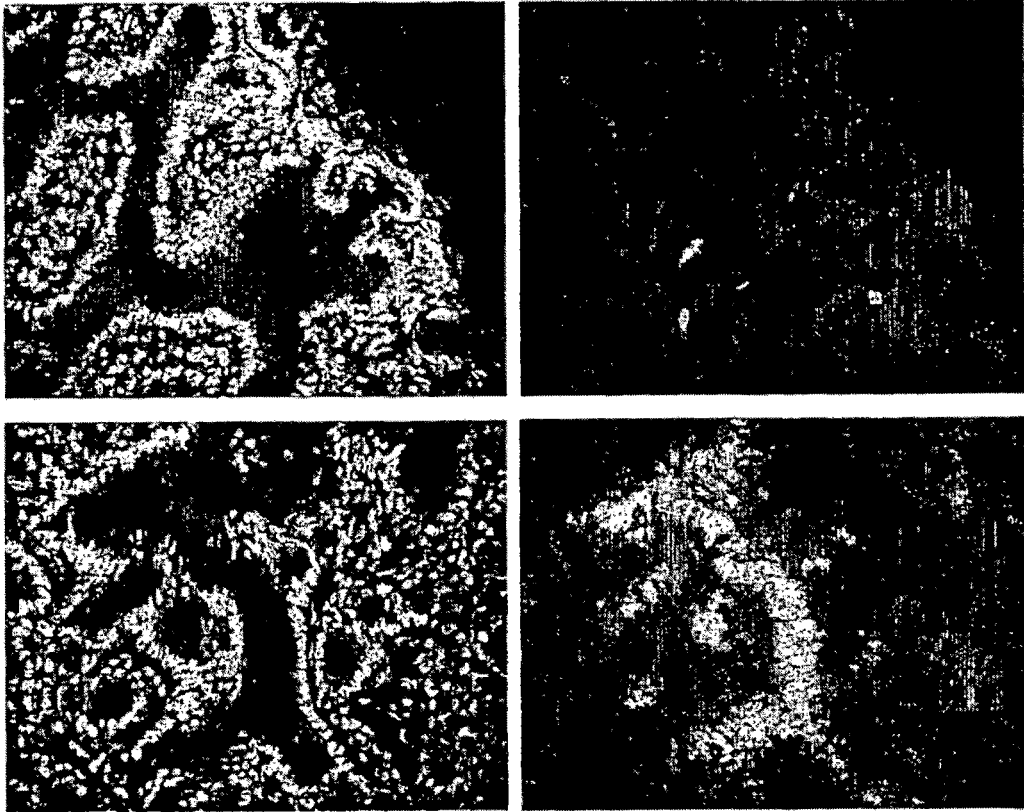


Figura 1

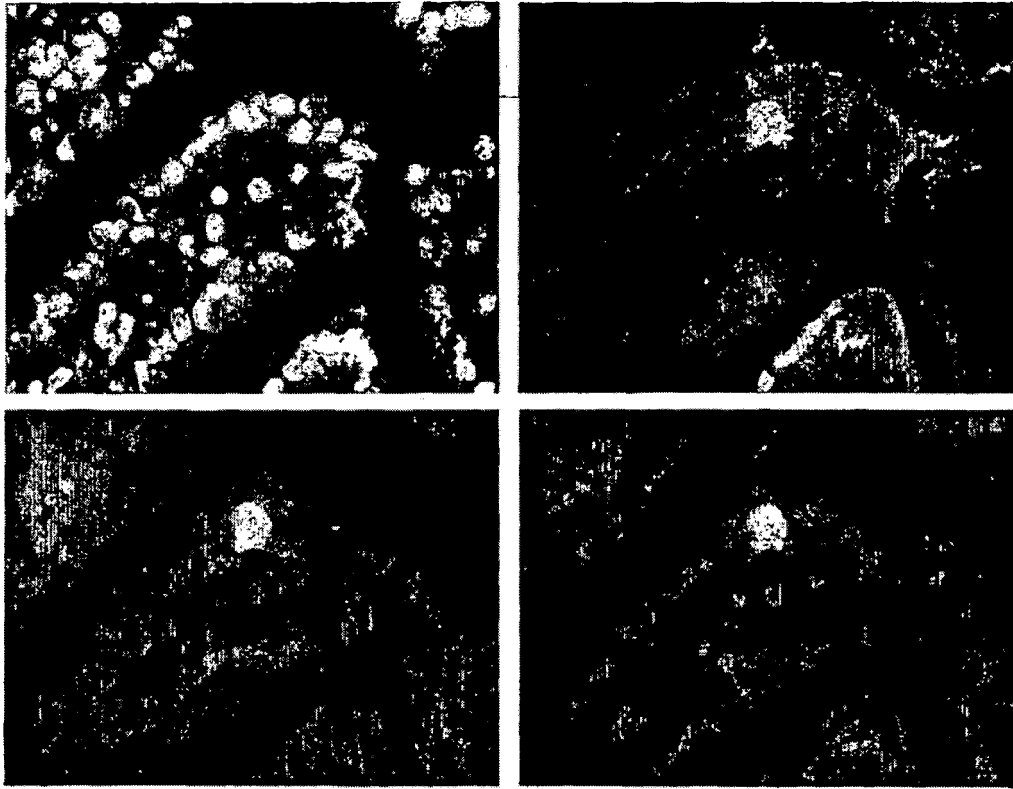


Figura 2

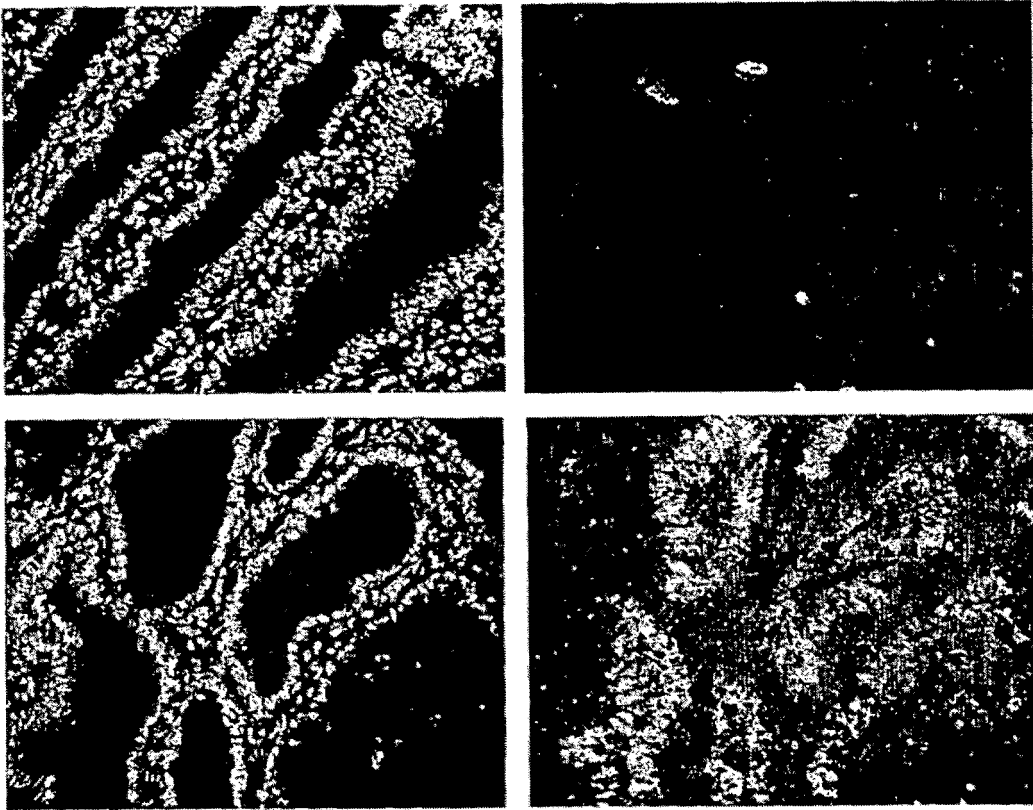


Figura 3

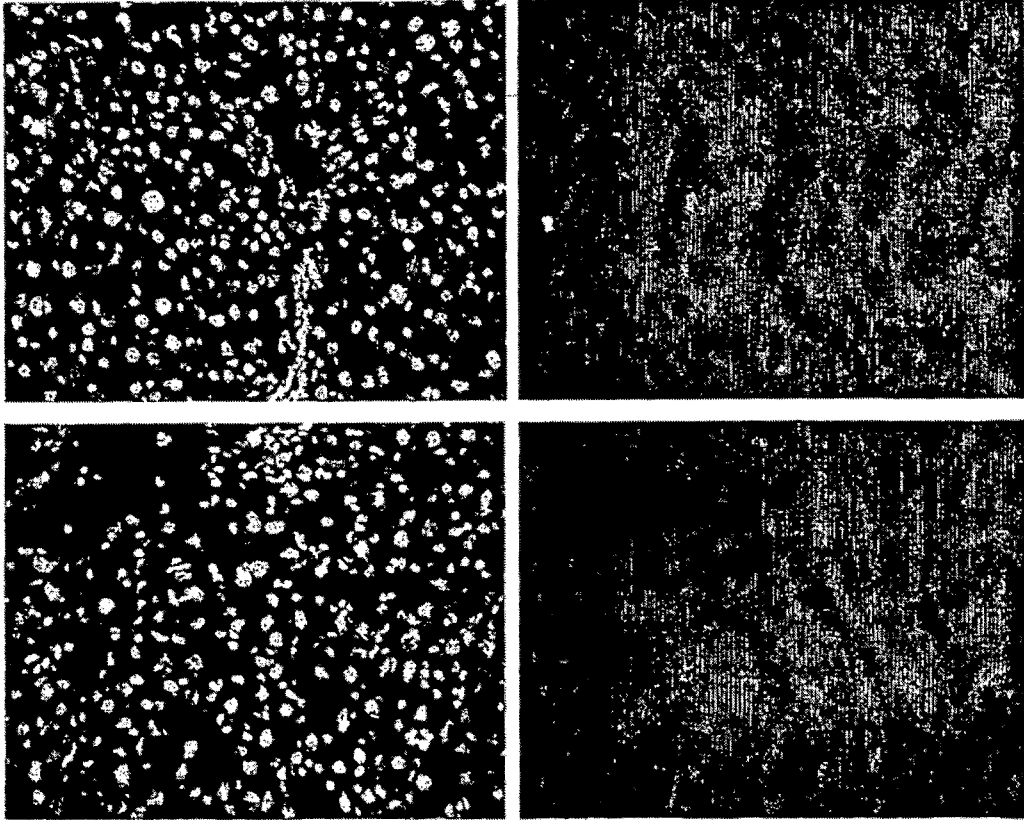


Figura 4

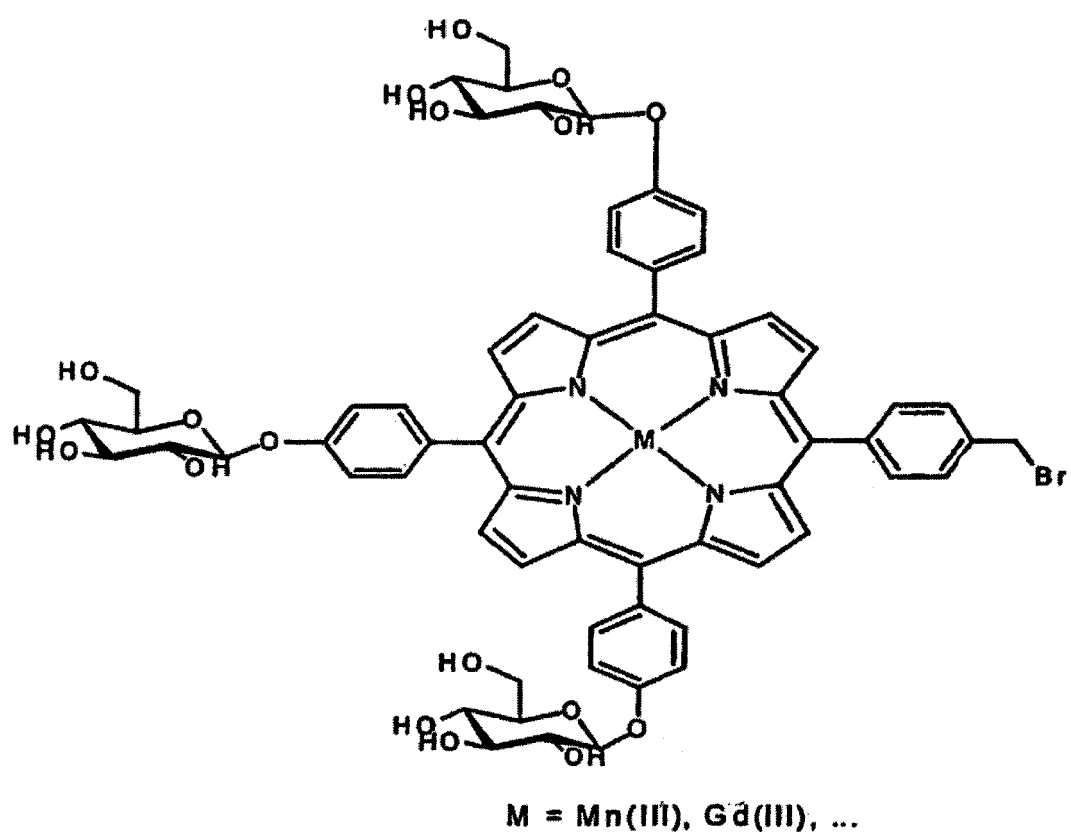


Figura 5

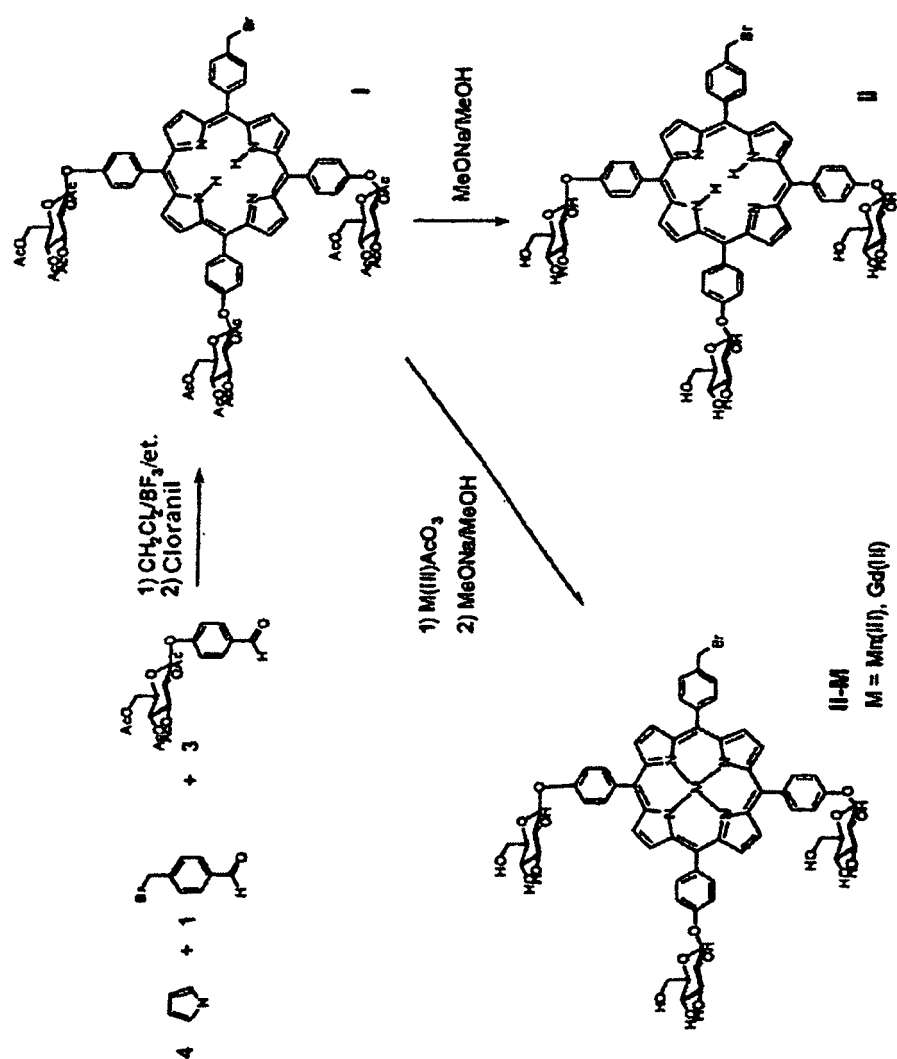


Figure 6

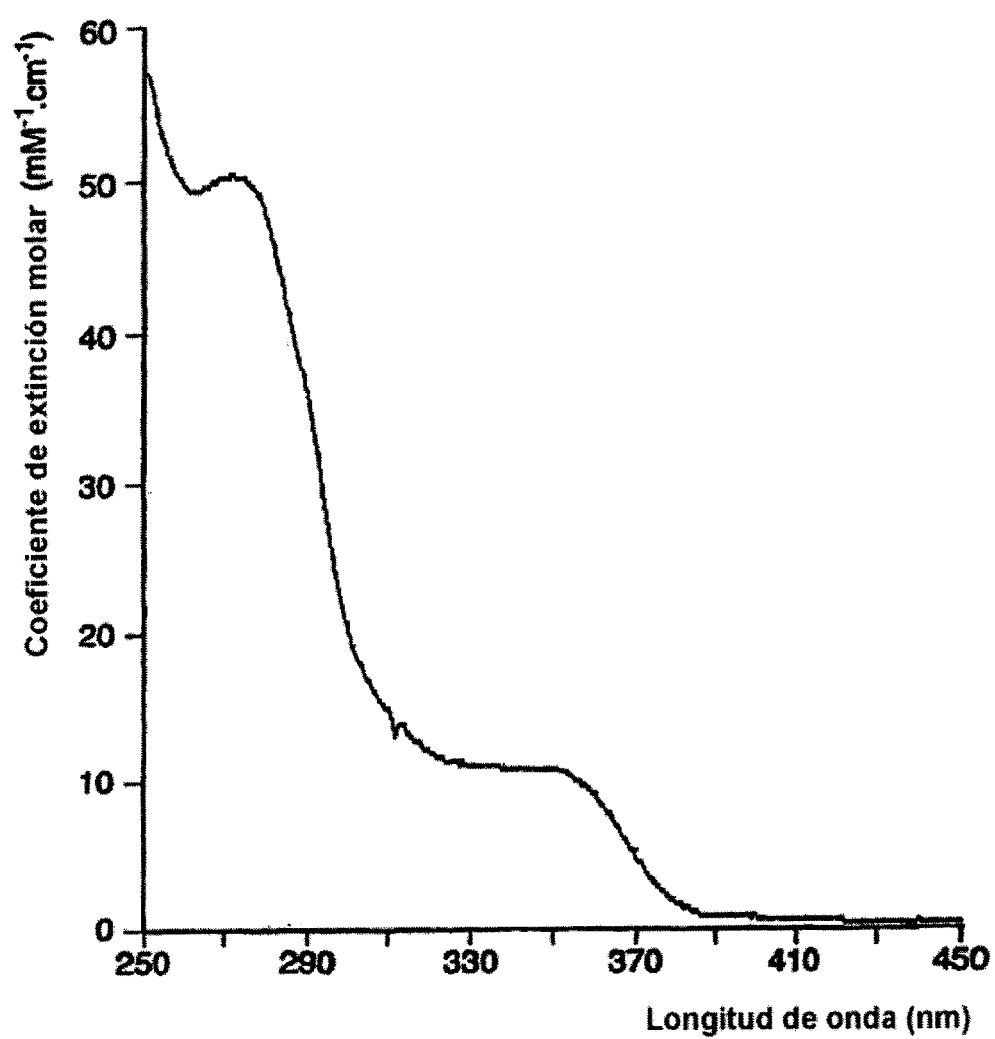


Figura 7

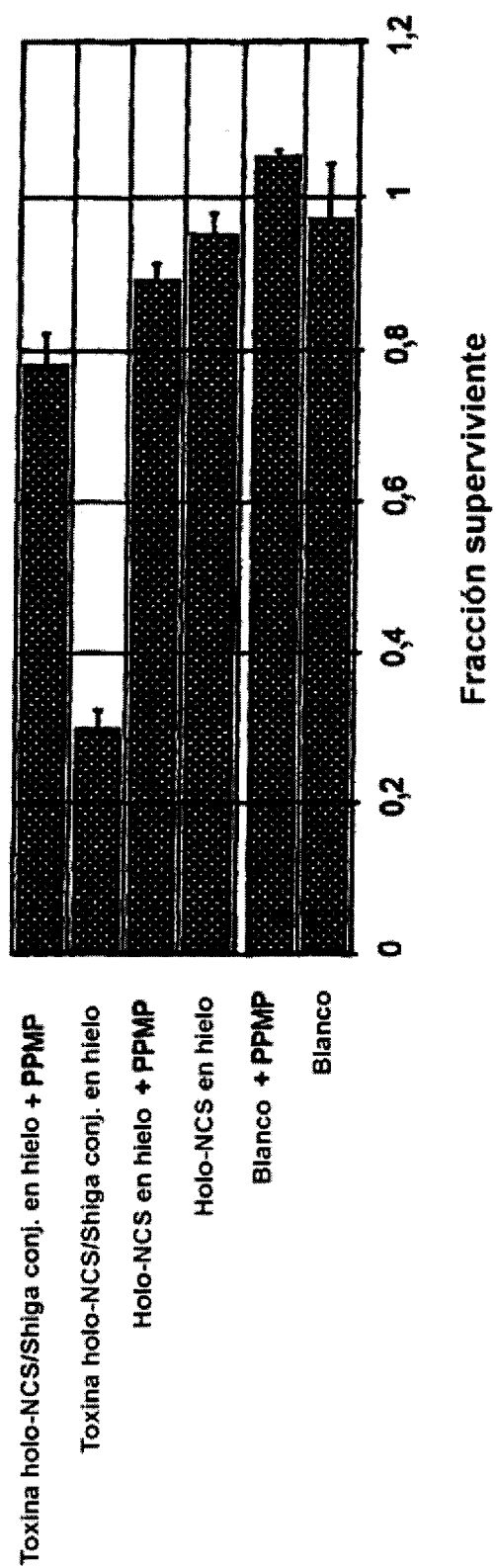


Figura 8

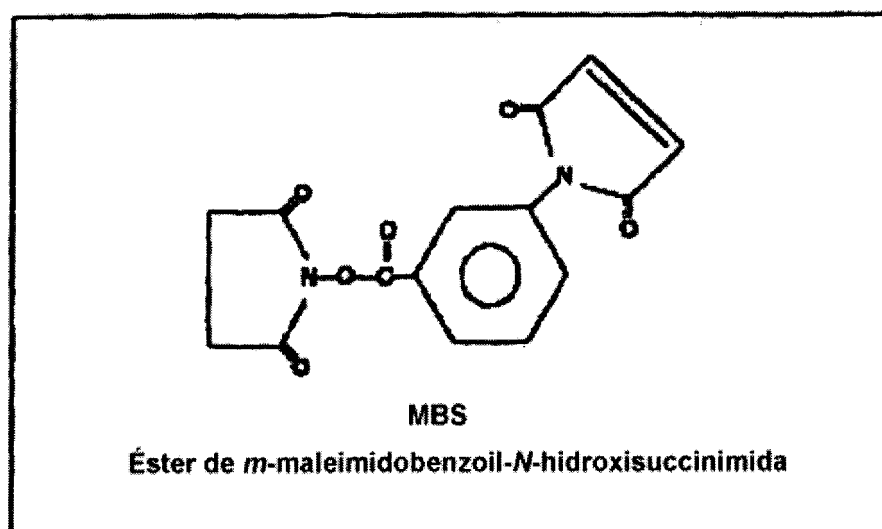
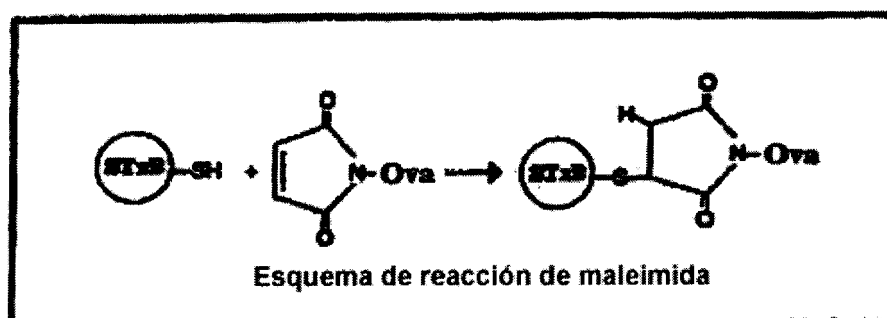
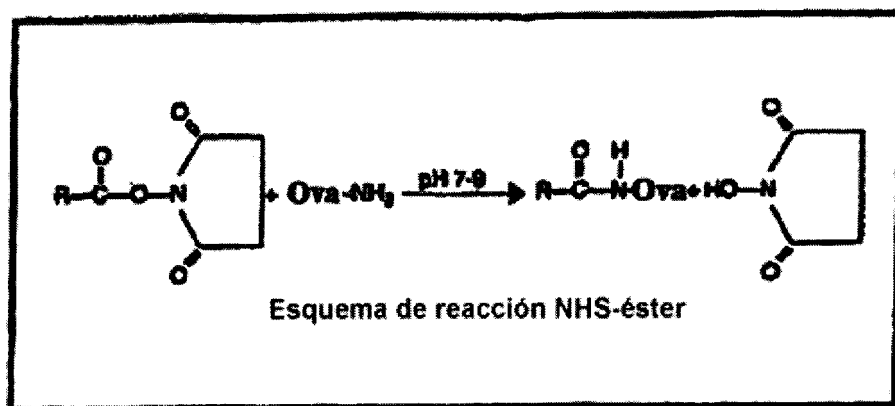


Figura 9

Figura 10: Sobreexpresión de Gb₃ por tumores humanos y murinos

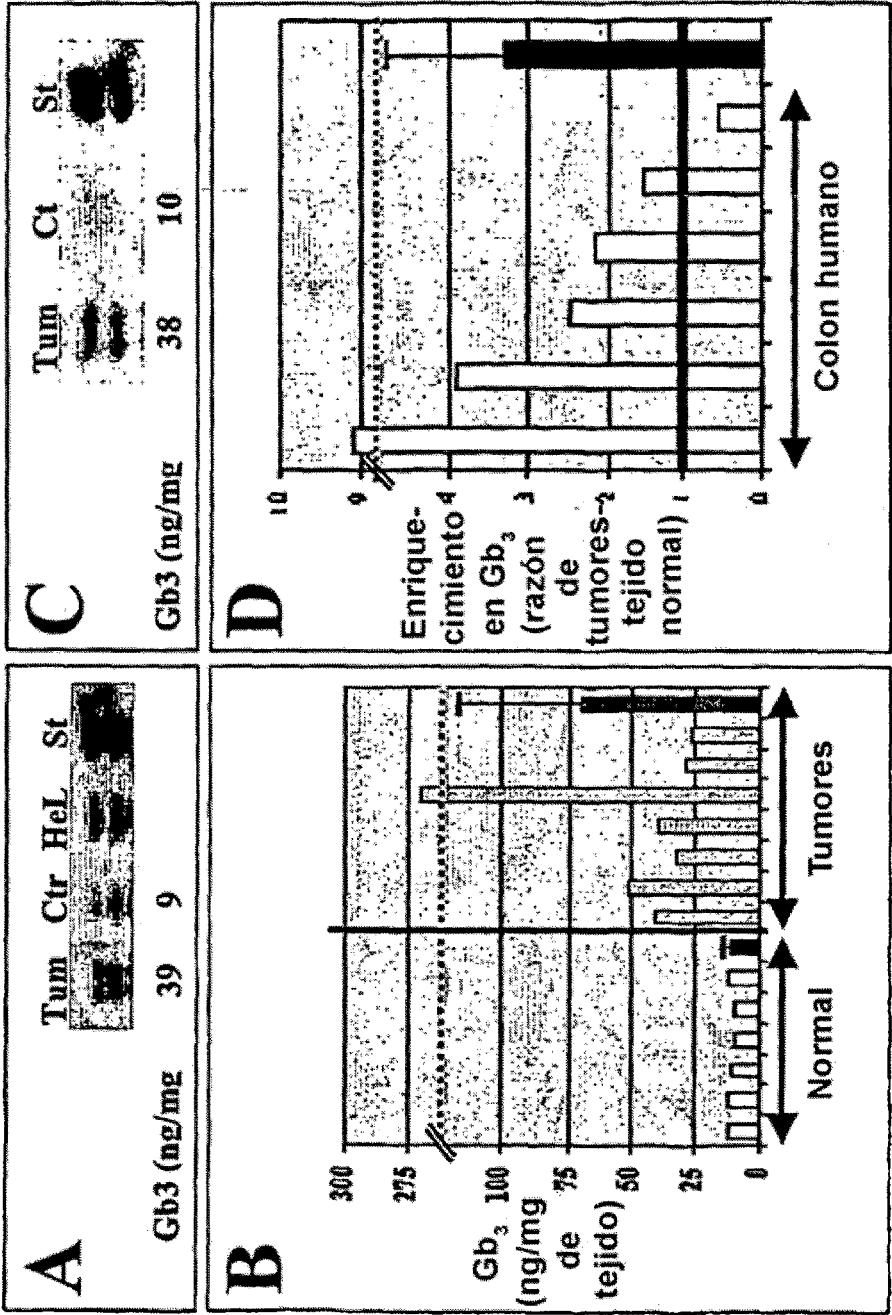


Figura 11: Obtención de imágenes de tumores usando microscopía multifotónica

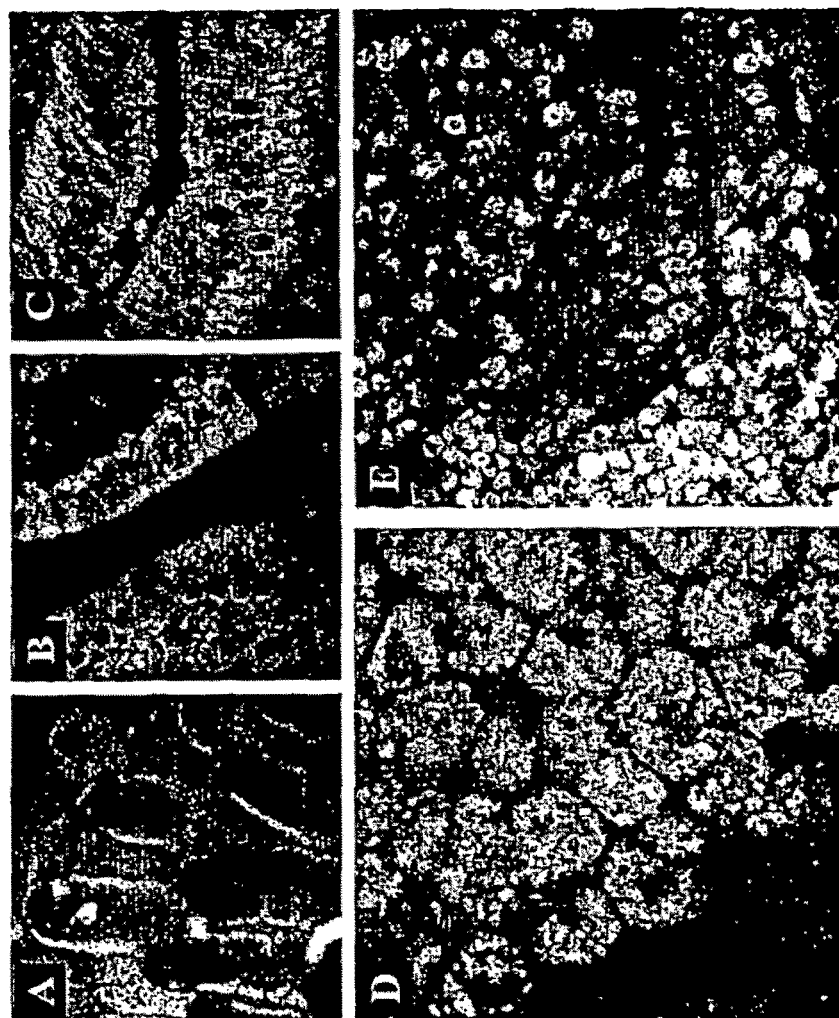


Figura 12: Vectorización de metaloporfirina hacia células cancerosas

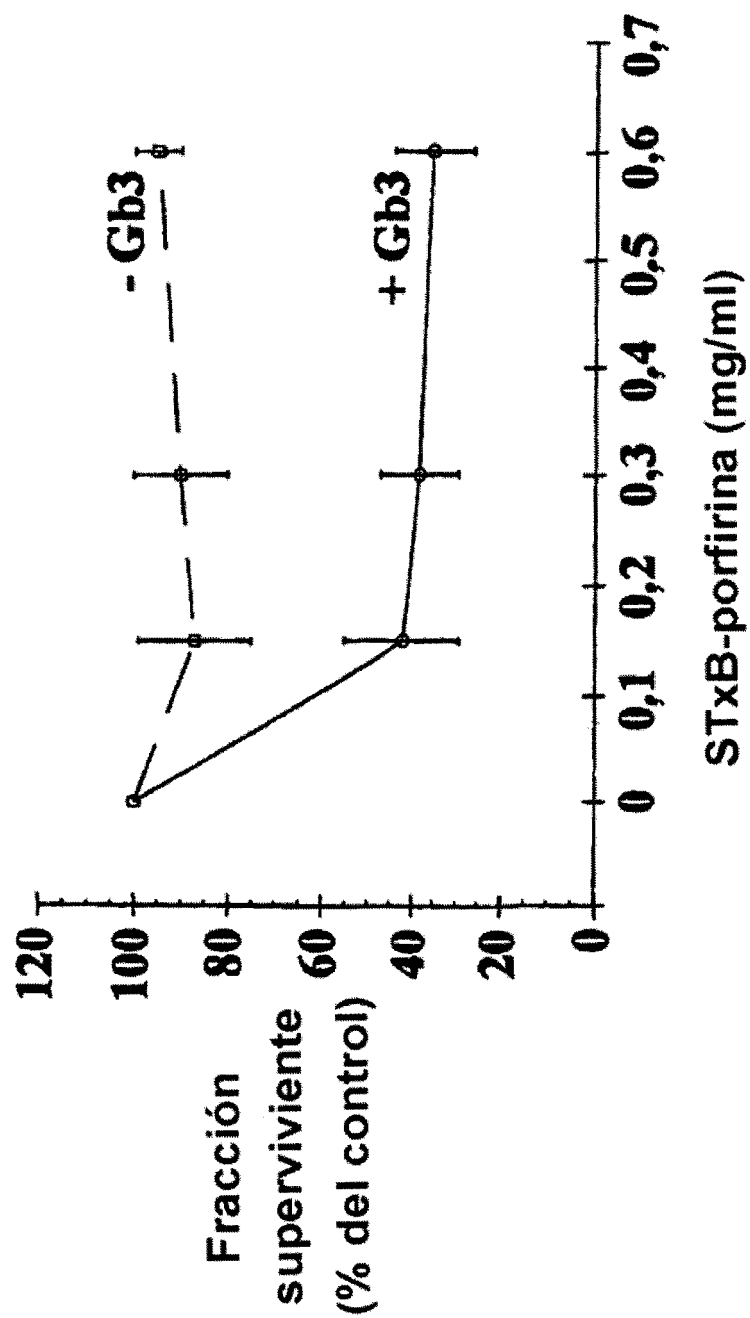


Figura 13: Análisis del direccionamiento de β -GUS dependiente de STxB hacia la ruta retrógrada de células cancerosas

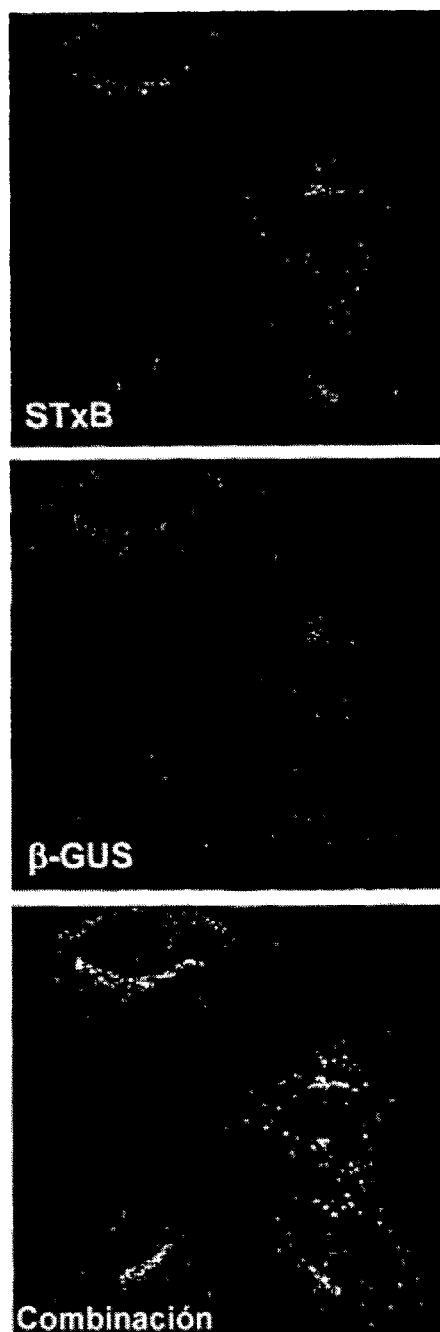


Figura 14: Vectorización de la actividad de β -GUS sobre células cancerosas

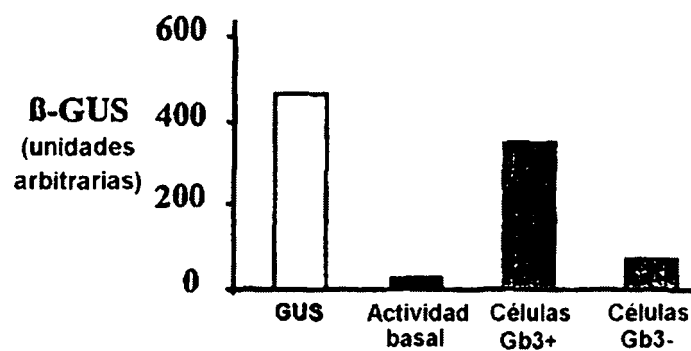


Figura 15:

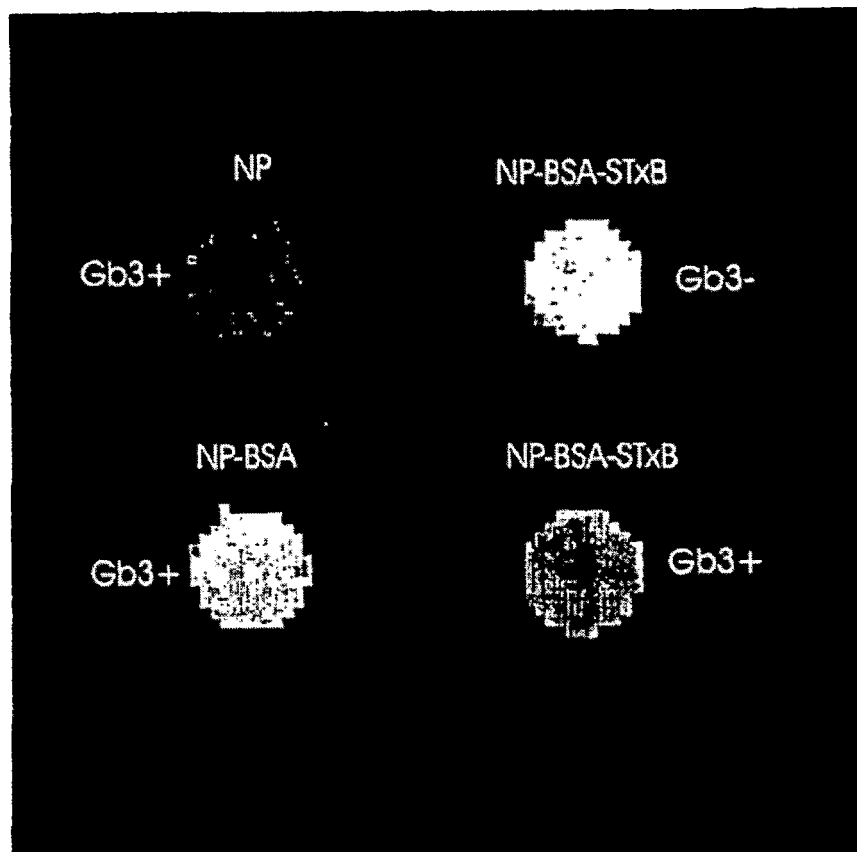


Figura 16: Direccionamiento de biotina acoplada a STxB-EDEKKK hacia el aparato de Golgi de células HeLa

