



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 292 587**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/35 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

A61P 37/08 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **01936257 .3**

(86) Fecha de presentación : **20.04.2001**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1283719**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **19.02.2003**

(54) Título: **Agentes apoptóticos.**

(30) Prioridad: **22.04.2000 DE 100 20 095**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

(73) Titular/es: **PharmedArtis GmbH**
Forckenbeckstrasse 6
52074 Aachen, DE

(72) Inventor/es: **Barth, Stefan;**
Engert, Andreas y
Stöcker, Michael

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Agentes apoptóticos.

Es objeto de la presente invención una proteína de fusión recombinante, que comprende al menos una granzima y un dominio de unión específico de la célula especialmente de origen humano, así como ácidos nucleicos y vectores que codifican una proteína de fusión de este tipo. Adicionalmente, procedimientos para influir en el crecimiento celular y en la fisiología de células con el complejo de acuerdo con la invención, o vectores que contienen el ácido nucleico que codifican para este. La invención se refiere además a vectores y huéspedes para producir el complejo de acuerdo con la invención. Además a la preparación y distribución de medicamentos basados en el complejo de acuerdo con la invención o vectores que codifican para este, para el tratamiento de enfermedades que se basan en una multiplicación patológica y/o una actividad elevada de poblaciones celulares estructuralmente definidas. Esto es válido especialmente para enfermedades tumorales, alergias, enfermedades autoinmunes, reacciones de inflamación crónicas o reacciones de rechazo de tejidos.

En el tratamiento con medicamentos de tumores, enfermedades autoinmunes, alergias y reacciones de rechazo de tejidos se evidencia como desventajoso que los medicamentos disponibles hoy en día como agentes quimioterapéuticos, corticoesteroides e inmunosupresores, debido a su inespecificidad relativa, presentan un potencial a veces considerable en efectos secundarios. Se ha investigado mitigar esto mediante distintos conceptos terapéuticos es un planteamiento. El uso de agentes inmunoterapéuticos que ha conducido especialmente al aumento de la especificidad de medicamentos, especialmente en el tratamiento de tumores.

Si el agente inmunoterapéutico es una inmunotoxina, se acopla un anticuerpo monoclonal (moAk) o un fragmento de anticuerpo, que presenta una afinidad cinética con marcadores de superficie de células tumorales, con un reactivo citotóxico. Si el agente inmunoterapéutico es un conjugado anti-inmune para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, reacciones de rechazo de tejido o alergias, se acopla una estructura de relevancia para la patogénesis o un fragmento del mismo a un componente toxina. Se ha evidenciado que se pueden caracterizar inmunotoxinas en uso clínico por alta inmonogenicidad. De este modo en el paciente se llega al desarrollo de anticuerpos neutralizantes que inactivan la inmunotoxina. En general es ineludible una toma de varias veces y/o continua de los terapéuticos para efectos curativos a largo plazo. Esto es especialmente evidente en la supresión de reacciones de rechazo de tejidos después de transplantes, o en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, mediante predominancia condicionada genéticamente parcialmente documentada para una reacción autoinmune patógena.

Proteínas de fusión recombinantes basadas en proteasas autólogas que inducen la apoptosis (agentes apoptóticos)

Para conseguir un efecto terapéutico directo en las células diana se ha unido anticuerpos con elementos radioactivos o con toxinas dando los denominados conjugados radioinmunes o inmunotoxinas (IT). En el uso de anti-B-células-moAk marcadas radiactivamente en linfomas de células B se pudieron observar regresiones de tumores e incluso remisión completa (Jurcic, J. G. y Scheinberg, D.A. 1995; Kaminski, M.S. y col. 1996; Press, O.W. y col. 1993). Los resultados con moAk frente a tumores sólidos serían por contra más bien desilusionantes (LoBuglio, A. F. y Saleh, M. N. 1992; Saleh, M. N. y col. 1992). A este respecto una explicación evidencia penetración en tumor demasiado baja en base a su magnitud, especialmente en tumores mal vascularizados. En el desarrollo adicional se acoplaron por tanto fragmentos de anticuerpos o ligandos específicos de células diana en los efectores correspondientes. Serían razonables para la miniaturización una penetración en tejido y tumor mejores mediante mejores propiedades de difusión, así como una inmunogenicidad inferior esperada por reducción de los determinantes antígenos (Pirker, R. 1988; Yolota, T. y col. 1992). Mejores técnicas de clonación hacen posible la preparación completamente recombinante de IT. Las informaciones genéticas de dominios variables de un moAk se unen entre ellos a este respecto con un conector de (Gly₄Ser)₃ sintético dando un fragmento de hebra simple (scFv). Mediante una fusión adicional sobre plano del ADN, se fusiona el dominio catalítico, por ejemplo, una toxina, en el scFv (Chaudhary, V. y col. 1990; Chaudhary, V. y col. 1989). Además del uso de scFv se pueden acoplar también ligandos para receptores específicos de células tumorales en la toxina (Klimka, A. y col. 1996). Además de estos enlaces activos se pueden usar también estructuras de unión pasivas para el direccionamiento específico de la célula. La diferencia esencial se basa en el hecho que inmunoglobulinas como anticuerpos y receptores de células T “reconocen” autoantígenos y alérgenos. Si el agente inmunoterapéutico también es un conjugado anti-inmune para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, reacciones de rechazo de tejido o alergias, se acopla una estructura de relevancia para la patogénesis o un fragmento del mismo a un componente de toxina (Brenner, T. y col. 1999).

Las toxinas de células peptídicas usados hasta ahora en la mayoría de los casos y por tanto mejor caracterizadas son la toxina bacteriana difteriotoxina (DT) (Beaumelle, B. y col. 1992; Chaudhary, V. y col. 1990; Kuzel, T. M. y col. 1993; LeMaistre, C. y col. 1998), *Pseudomonas Exotoxin A* (PE) (Fitz Gerald, D. J. y col. 2000; O'Hare, M. y col. 1990; Schnell, R. y col., 2000; Thorpe, P.E. y col. 1988; Youle, R. J. y Neville, D. M. J. 1980). El mecanismo de acción citotóxico es igual en todas estas toxinas a pesar de su diferente trasfondo evolucionario. El dominio catalítico inhibe la biosíntesis proteica mediante modificación del factor de elongación EF-2 de importancia para la translación o de los ribosomas directamente de modo que el EF-2 ya no se puede unir (Endo, Y. y col. 1987; Iglewski, B. H. y Kabat, D. 1975).

La administración sistemática de inmunotoxinas conduce en la mayor parte de las construcciones usadas hasta ahora a efectos secundarios más o menos fuertes. Además del síndrome de “pérdida vascular” (Baluna, R. y Vitetta,

E. S. 1997; Schnell, R. y col. 1998; Vitetta, E. S. 2000) se llega en función de la construcción usada y de la dosis aplicada a trombocitopenia, hemólisis, insuficiencia renal y náuseas. Se pudo observar también lesiones hepáticas dependientes de la dosis y reversibles (Battelli, M. G. y col. 1996; Grossbard, M. L. y col. 1993; Harkonen, S. y col., 1987). La inmunogenidad que se observa con el uso del inmunoconjugado o inmunotoxina de la construcción usada es junto con los efectos secundarios documentados el problema central de la inmunoterapia (Khazaeli, M. B. y col. 1994). Esto se refiere especialmente a la defensa humoral contra los dominios catalíticos usados como ricina (HARA) (Grossbard, M.L. y col. 1998), PE (Kreitman, R. J. y col. 2000), o DT (LeMaistre, C. F. y col. 1992). Teóricamente todas las estructuras no humanas pueden provocar una respuesta inmunológica. Se establecen por tanto los límites de una toma repetida de inmunotoxinas e inmunoconjugados. La consecuencia lógica de esta problemática es el desarrollo de inmunotoxinas humanas (Rybak, S. y col. 1992).

Hasta ahora se reclutan toxinas humanas para el uso en inmunotoxinas exclusivamente de las denominadas ribonucleasas. Una vez se pudo demostrar el potencial citotóxico de la ARNasa humana A mediante microinyección en células (Rybak, S. y col. 1991), se acopló esta químicamente en un moAK anti-CD5 y se ensayó con éxito en un modelo *in vivo* (Newton, D. L. y col. 1992). Debido a que las ARNasas humanas están presentes en líquidos extracelulares, plasma y tejidos, se parte de que estas son menos inmunógenas en un uso en inmunotoxinas. La angiogenina (ANG), una proteína de 14 kDa con una homología de secuencia del 64% con ARNasa A, se aisló por vez primera del medio acondicionado de células tumorales, donde se ponía de manifiesto para inducir en base a su capacidad de crecimiento de vasos (Fett, J. W. y col. 1985). Se pudo mostrar que la actividad de ARNasa específica de ARNt de angiogenina tenía potencial citotóxico (Saxena, S. K. y col. 1992; Saphiro, R. y col. 1986). En correspondencia las inmunotoxinas conjugadas químicamente mostraron en lo sucesivo una actividad tóxica específica de la célula (Newton, D. y col. 1996; Yoon, J.M. y col. 1999). Para evaluar la actividad de inmunotoxinas scFv basadas en ANG se construyeron distintas conformaciones de ANG con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y se probaron con éxito *in vitro* (Yoon, J. M. y col. 1999). Un integrante más de la superfamilia de las ARNasas es la neurotoxina eosinófila (EDN). Para la EDN de 18,4 kDa de tamaño sólo se pudo describir hasta ahora la neurotoxicidad directa. En base a la potencia documentada se construyeron distintas inmunotoxinas basadas en EDN y se ensayaron *in vitro* igualmente con éxito (Newton, D. y col. 1994; Zewe, M. y col. 1997).

Los nuevos estudios muestran que la ANG se puede bloquear con un inhibidor de la ribonucleasa (RI) citoplasmática propia de la célula. Esto limita la actividad de IT basada en ANG en células diana RI(+) (Leland, P.A. y col. 1998).

La invención se basa en los siguientes problemas técnicos:

disminución de la inmunogenidad de los agentes inmunoterapéuticos, disminución de la reducida actividad de acción por inactivación inespecífica así como mejora de la reducida actividad de acción por inhibidores específicos propios del huésped.

Estos problemas se solucionan mediante una proteína de fusión recombinante que está formada por al menos un componente A y al menos un componente B, en donde el componente A es una actividad de unión para estructuras de superficie celulares y el componente B es una granzima.

La proteína de fusión de acuerdo con la invención comprende al menos dos dominios, un dominio efector y un dominio de unión.

El dominio efector se compone de una granzima, preferiblemente granzima B en humanos. El dominio de unión se componen de una estructura que hace posible una unión e internalización en células diana estructuralmente definidas.

Es ventajoso que el dominio catalítico se trate de una proteína propia del cuerpo o un derivado de la misma y se condicione así que se reduzca drásticamente la inmunogenidad que se espera. Especialmente las células reactivas del sistema inmune que se van a eliminar en relación con enfermedades autoinmunes, alergias y reacciones de rechazo de tejidos, se tratan en el sentido fisiológico de células normales. Se puede esperar de estas células una sensibilidad normal frente a elementos naturales que inducen la apoptosis.

Preferiblemente la proteína de fusión de acuerdo con la invención muestra además de los componentes A y B, uno o varios componentes S suplementarios. El especialista en la técnica conoce en base a su experiencia que características y propiedades adicionales pueden tener contribución decisiva para la preparación eficiente y/o actividad de proteínas de fusión de acuerdo con la invención. Condicionado por la diversidad de las proteínas de fusión de acuerdo con la invención respecto a las enfermedades que se van a tratar puede ser necesaria una adaptación de las proteínas de fusión a la cada realidad.

Preferiblemente se selecciona el componente A de la proteína de fusión de acuerdo con la invención del grupo de estructuras de unión activas, compuesto por anticuerpos, sus derivados y/o fragmentos, péptidos sintéticos o moléculas químicas, ligandos, lectinas, moléculas de unión al receptor, citocinas, linfocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, los antígenos CD (grupo de diferenciación), receptores de citocinas, de hormonas, del factor de crecimiento, bombas de iones, proteínas que forman canales y sus derivados, mutantes o combinaciones de las mismas.

En una forma de realización adicional de la proteína de fusión de acuerdo con la invención, esta se caracteriza porque el componente A se selecciona del grupo de estructuras de unión pasivas de alérgenos, alérgenos peptídicos, alérgenos recombinantes, anticuerpos idiotípicos de alérgenos, estructuras de excitación autoinmune, estructuras que inducen el rechazo de tejidos y sus derivados, mutantes o combinaciones de las mismas.

El componente B de la proteína de fusión de acuerdo con la invención posee especialmente propiedades proteolíticas o es al menos una proteasa, sus derivados, mutantes o combinación de la misma.

Ninguno de los dominios efectores descritos hasta ahora en inmunotoxinas usan propiedades proteolíticas e inician directamente los mecanismos naturales para el comienzo de la apoptosis en las células diana. Los efectos de inmunotoxinas descritos hasta ahora se basan siempre en una alteración o inhibición de la traslación a las células diana. El perjuicio en la vitalidad de las células resultante de esto puede conducir indirectamente a un comienzo de la apoptosis (Bolognesi, A. y col. 1996; Keppler-Hafkemeyer, A. y col. 1998; Keppler-Hafkemeyer, A. y col. 2000). Preferiblemente el componente B de la proteína de fusión de acuerdo con la invención activa componentes de la apoptosis inherente a células directamente e induce con ello la apoptosis en las células definidas con la unión del componente A.

Se prefiere especialmente la granzima B (GB) o un derivado del mismo como componente B de la proteína de fusión de acuerdo con la invención. Es de especial interés la proteasa granzima B dependiente de la serina y específica de aspartamo. La granzima B es un componente de la defensa inmune celular que se extrae tras activación de células T citotóxicas (CTL) o de células asesinas naturales (NK) de los gránulos citotóxicos de estas células (Kam, C. M. y col. 2000; Shresta, S. y col. 1998). Después de la translocación dependiente de la perforina de granzima B en el citoplasma de células atacadas se inicia una cascada proteolítica, que finaliza en la apoptosis de las células diana (Greenberg, A.H. 1996). La función exacta de la perforina extraída con la granzima B aún es discutida en la actualidad, pero no es únicamente poder inducir la apoptosis. La perforina se conserva en la membrana celular junto a 12 a 18 meros y forma con ellos poros de 15 a 18 nm. Originalmente se partió de que la granzima B llega por estos poros al citoplasma de las células diana. Sin embargo la proteína granzima B de 32 kDa es demasiado grande para este paso. Es probable la suposición de que tras unión de la granzima B a perforina e internalización sucesiva de este complejo, la perforina ayude a la liberación endosomal de granzima B (Jans, D.A. y col. 1996). En los últimos años se pudieron identificar distintas proteínas que se activan mediante escisión mediada por GB y se encuentran en relación directa con la apoptosis. De este modo se pudo documentar la activación proteolítica condicionada por GB *in vitro* de distintas procaspasas, especialmente 3 y 8 (Fernandes-Alnemri, T. y col. 1996; Srinivasula, S. M. y col. 1996), que se cuentan entre las proteasas centrales en la apoptosis (Nicholson, D. W. y Thornberry, N. A. 1997). La granzima B desarrolla otras actividades citotóxicas en el núcleo celular. La granzima B se translocaliza de modo relativamente rápido en función de la caspasa en los núcleos celulares, después de penetrar en el citoplasma de las células diana (Pinkonski, M. J. y col. 2000). Ahí la granzima B puede, por ejemplo, cortar el antígeno de matriz nuclear y la polimerasa poli(ADP-ribosa) (Andrade, F. y col. 1998). Se pudo observar una rápida apoptosis en células, una vez acumulada granzima B en el núcleo celular (Trapani, J. A. y col. 1998; Trapani, J. A. y col. 1998). Otros datos confirman el inicio de la apoptosis mediante la escisión proteolítica directa de la Bid; un integrante de la familia Bcl-2 con sólo un dominio BH3. La forma acortada tBid después de la escisión se conserva en la membrana mitocondrial y esta se despolariza. De este modo se induce la liberación de citocromo C y un factor que induce la apoptosis desde las mitocondrias en el citoplasma, lo que acelera de forma decisiva la muerte celular (Sutton, V.R. y col. 2000). Se pudieron describir otras propiedades tóxicas de la granzima B dependientes de la caspasa, sin que quedase claro hasta ahora el mecanismo en que se basan (Beresford, P. J. y col. 1999; Sarin, A. y col. 1997).

Otras formas de realización de las proteínas de fusión de acuerdo con la invención pueden contener uno o varios componentes S distintos. El especialista en la técnica puede valorar en base a su conocimiento las ventajas y necesidad de componentes y/o características adicionales en relación con las proteínas de fusión de acuerdo con la invención. Los componentes S pueden servir, por ejemplo, para los siguientes fines:

- La regulación inducible de la capacidad de síntesis (por ejemplo, promotores inducibles).
- El control de la biosíntesis de proteínas (por ejemplo, secuencia guía).
- La purificación del complejo o de sus componentes (por ejemplo His-Tag, afinidad-Tags).
- La translocación del agente apoptótico en las células diana (por ejemplo, dominios de translocación, secuencias anfipáticas).
- La activación intracelular del componente B (pro-granzima B sintética, secuencias anfipáticas).

Son objeto de la invención también moléculas de ácido nucleico, o vectores, que codifican la proteína de fusión de acuerdo con la invención o para componentes individuales para la preparación de la proteína de fusión. Los inventores han conseguido documentar la expresión de agentes apoptóticos en células eucarióticas de origen humano. Esto se asienta estrechamente en la idoneidad de ácidos nucleicos que codifican para una proteína de fusión de acuerdo con la invención, también para fórmulas de terapia génica. El especialista en la técnica puede reconocer en base a su conocimiento los múltiples aspectos y posibilidades de intervenciones de terapia génica en relación con las distintas enfermedades que se van a tratar. Además de la administración local de vectores relativamente inespecíficos (por ejemplo, lípidos catiónicos, vectores no virales, adenovirales y retrovirales) será también posible próximamente una

administración sistémica con vectores específicos de la célula diana modificados. Hasta que se encuentren disponibles tales sistemas, la transfección dirigida de poblaciones celulares definidas *ex vivo* y sus recuperación ofrece una alternativa interesante en el organismo que se va a tratar (Chen, S. y col. 1997).

- 5 También se reivindican de acuerdo con la invención organismos que sintetizan proteínas de fusión de acuerdo con la invención completas tras transformación o transfección con las moléculas de ácido nucleico o vectores de acuerdo con la invención.

10 Medicamentos que contienen una proteína de fusión de acuerdo con la invención. De forma típica se suministran las proteínas de fusión de acuerdo con la invención en formas de presentación fisiológicamente aceptables. A estas pertenecen, por ejemplo, tampón tris, de NaCl, de fosfato y todos los sistemas tampón permitidos, especialmente también sistemas tampón que se caracterizan por adición de estabilizadores de proteína permitidos. La aplicación se realiza especialmente por vía parenteral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratumoral, transnasal así como administración por la mucosa.

15 La dosis de la proteína de fusión de acuerdo con la invención que se va a administrar se debe determinar para cada administración de nuevo para cada enfermedad que se somete a terapia mediante estudios clínicos de fase I (estudios de dosis crecientes).

20 Se suministran ácidos nucleicos o vectores, que codifican una proteína de fusión de acuerdo con la invención, de forma ventajosa en formas de presentación fisiológicamente aceptables. A estas pertenecen, por ejemplo, tampón tris, de NaCl, fosfato y todos los sistemas tampón permitidos, especialmente también sistemas tampón que se caracterizan por adición de estabilizadores permitidos para los ácidos nucleicos y/o vectores que se van a usar. La administración se realiza especialmente por vía intravenosa parenteral, subcutánea, intramuscular, intratumoral, administración por vía transnasal así como administración por la mucosa.

La proteína de fusión de acuerdo con la invención y/o moléculas de ácido nucleico que codifican esta se pueden usar para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades malignas, alergias, reacciones autoinmunes, reacciones inflamatorias crónicas o reacciones de rechazo de tejidos.

30 En el ejemplo del agente apoptótico anti-CD30 Ki-4(scFv)-granzima B (véase abajo) (KGbMH) se pudo demostrar la actividad citotóxica de una proteína de fusión que se basa en la presente invención en el ejemplo de la línea celular de Hodgkin L540Cy. La segregación de esta proteína de fusión funcional de células eucarióticas demuestra además la adecuación potencial de las proteínas de acuerdo con la invención para un uso en terapia génica.

35 *Preparación del agente apoptótico específico de CD30 recombinante Ki-4(scFv)-granzima B (KGbMH)*

Procedimientos

40 *Bacterias, oligonucleótidos y plásmidos*

Se usaron XL1- blue de *E. coli* para la propagación de los plásmidos. Se adquirieron oligonucleótidos sintéticos de la compañía MWG (Martinsried, Alemania). La preparación de los plásmidos se realizó según el procedimiento de lisis alcalina y se purificaron con ayuda del kit de purificación de plásmido de Qiagen (Hilden, Alemania).

45 *Líneas celulares*

Se cultivaron todas las líneas celulares usadas (tabla 1) en medio complejo (RPMI-1640, FCS al 10%, 50 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina) a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

50 El enriquecimiento/cultivo de células transfectadas se realizó con presión de selección con 100 µg/ml de zeocina.

TABLA 1

55 *Líneas celulares usadas*

Línea celular	Origen	Referencia
293T	Células renales embrionarias humanas	(Graham, F. L. y col. 1977)
L540Cy	Linfoma de Hodgkin	(Kapp, U. y col. 1992)
IMR5	Neuroblastoma	(Bukovsky, J. y col. 1985)

Técnicas de clonación

Técnicas recombinantes

5 Para la clonación, análisis y construcción de distintos fragmentos de ADN y los plásmidos usados se aplicaron técnicas convencionales (Sambrook, J. y col. 1989). Se contemplaron las respectivas instrucciones de uso de los fabricantes para el uso de sus productos, especialmente en enzimas y kits. Se usaron enzimas y kits de las compañías Qiagen, Roche, NEB, AGS y Genecraft.

10 *Preparación de ADNc*

Se obtuvo ARN humano a partir de sangre completa con ayuda del kit QIAamp RNA Blood Mini. El ARN así obtenido se transcribió en ADNc con el kit de síntesis First-Strand cDNA de Pharmacia Biotech. Además de los cebadores preparados en el kit se usaron para la síntesis de la primera hebra también los cebadores específicos para granzima B.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

20 Se amplificó la primera hebra del ADNc inmediatamente en una PCR con los cebadores específicos de GB. El diseño de los cebadores se orientaba a los datos de secuencia disponibles en la base de datos genética PubMed con el número de acceso NM_004131.

La PCR se llevó a cabo en condiciones convencionales en un termociclo Primus (MWG, Martinsried). Programación convencional: 96°C, 5'; 30x (96°C, 1'; 60°C, 1'; 72°C, 1'); 72°C, 4'.

25 *Clonación de los plásmidos de expresión eucarióticos*

El plásmido base para la clonación y expresión eucariótica de las proteínas de fusión de GB recombinantes fue el pSecTag2 (Invitrogen, Países Bajos). Tras distintas clonaciones y modificaciones en la región del MCS y del epítipo marcador, los inventores estarían en la situación de poder clonar el Ki-4(scFv) a partir del vector de expresión bacteriano pBM1.1-Ki-4 (Barth, S. y col. 2000) y mediante Xho I/célula II la granzima B en el plásmido pMS de nueva configuración.

35 Otros plásmidos de pMS derivados del aquí contenían el IVS y la secuencia de IRES así como la secuencia subsiguiente a la misma para el gen reportero EGFP (proteína fluorescente verde) del plásmido pIRES-EGFP (Clontech, EEUU). Esto hizo posible una determinación no complicada de la tasa de transfección y simplificó la selección de poblaciones de células transfectadas.

Todos los plásmidos usados disponían por tanto de las siguientes características:

- 40 - Promotor CMV para la expresión constitutiva de la construcción de GB.
- Guía Ig-Kappa murino para la segregación de inmunotoxinas.
- 45 - Secuencia de poliadenilación de BGH
- Gen de resistencia a la zeocina para la selección en eucariontes
- ColE1-Ori para la replicación en procariontes
- 50 - Gen de resistencia a la ampicilina para la selección en procariontes.

Las diferencias de plásmidos usados se representan en la figura 3. El plásmido pMS-kGb codifica por el contrario que el pMS-KGbMH para una proteína de fusión Ki-4(scFv)-granzima B sin Myc- y His-Tag y debería aclarar si las secuencias incorporadas al terminal C influyen en la funcionalidad de la inmunotoxina. La incorporación de la secuencia IVS/IRES/EGFP en estas dos construcciones debería aclarar un posible efecto del EGFP sobre la capacidad de síntesis de inmunotoxina de las células (por ejemplo, pMS-KGb IG/B y pMS KGb II).

Se representa en la figura 1 un ejemplo de la estructura completa de plásmidos pMS.

60 *Secuenciación*

La secuenciación de ADN se llevó a cabo según el procedimiento de ruptura de cadenas con dideoxy (Sanger, F. y col 1977). El kit *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* contiene todos los componentes necesarios para la reacción además de moldes y cebadores. Las reacciones de secuencia se llevaron a cabo en un termociclo Primus-96plus con manta calefactora (MWG-Biotech) sin aceite para reacción PCR.

Transfección de células eucarióticas

Las transfección de células eucarióticas se llevó a cabo con TransFast®, un lípido catiónico sintético (Promega). El plásmido usado pMS-KGII se encontraba disponible en el gen reportero EGFP. Las tasas de transfección en células 293T se encontraban entre 50 y 80%, lo que se pudo determinar mediante recuento de las células fluorescentes verdes en el microscopio de fluorescencia. La transfección se llevó a cabo según el protocolo del fabricante. Después de 3 días se hicieron reaccionar las células transfectadas en frascos de cultivo celular pequeños y se cultivaron y seleccionaron adicionalmente con presión de selección de Zeocin® (100 µg/ml).

Purificación de las proteínas recombinantes

Las purificaciones de proteína se llevaron a cabo a continuación con NiNTA (Qiagen). Este procedimiento de cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado (IMAC) usa la afinidad condicionada por la carga de clústeres de histidina (HisTag) en proteínas para unir a iones de Ni²⁺ inmovilizados sobre NTA (Hochuli, V. 1989; Porath, J. y col. 1975). Imidazol, un análogo de histidina, compite en la elución de proteínas recombinantes con el His-Tag.

Minipreparados de proteínas

Los minipreparados de proteína se realizaron en consonancia con el protocolo de Qiagen (*The Expressionist* 07/97) para la purificación nativa de proteínas con un His-Tag (Crowe, J. y col. 1994). Se lavó el NiNTA 3 veces antes del uso con 1 vez la cantidad de tampón de incubación y se conservó a 4°C (NiNTA al 50%). Realización del protocolo a temperatura ambiente, todas las etapas de centrifugación a 6000 revoluciones/minuto en una centrífuga de sobremesa.

Se centrifugan de 1,2 a 1,5 ml de sobrenadante celular durante 2' para sedimentar las células y los constituyentes celulares. Se adicionan a 900 µl de este sobrenadante de cultivo celular 300 µl de tampón de incubación 4 veces (NaH₂PO₄ 200 mM, pH 8,0; NaCl 1,2 M; imidazol 40 mM) y 30 µl de NiNTA al 50% en un recipiente Eppendorf de 1,5 ml. Se incuba durante 1 hora con agitación. Se centrifuga durante 1' y se deshecha el sobrenadante. El agregado de NiNTA se resuspende dos veces en 175 µl de tampón de incubación 1 vez y se deshecha respectivamente el sobrenadante tras centrifugación durante 1'. Se añaden 30 µl de tampón de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM; imidazol 250 mM) al agregado de NiNTA y se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se separa el agregado por centrifugación durante 1' y se traslada el sobrenadante con la proteína purificada a un nuevo recipiente de reacción Eppendorf.

Purificación de proteínas mediante columnas de afinidad con NiNTA

La purificación de proteínas por columnas de afinidad con NiNTA se llevó a cabo en un equipo de trabajo de Bio-Rad Biologic con un colector de fracciones modelo 2128 y un equipo informático controlador correspondiente. Los tampones usados son idénticos a los usados en el minipreparado de proteína. Tras la elución de las proteínas recombinantes se concentraron estas y se cambiaron de tampón.

Concentración de proteínas y cambio de tampón mediante ultrafiltración

Para emplear las proteínas purificadas en distintos ensayos se debieron concentrar las muestras eluidas por la columna de NiNTA, cuya concentración se determinó y se cambiaron de tampón. Mediante el cambio de tampón a PBS se separó también el imidazol dañino para las células del tampón de elución en las preparaciones.

Para la concentración y cambio de tampón se usó una cámara de ultrafiltración Amicon 2000 de la compañía Amicon y membranas de ultrafiltración Diaflo con un tamaño de espacio de poros para proteínas < 10 kDa. Con presión elevada de una botella de gas nitrógeno se concentraron las proteínas de fusión de GB y a continuación se cambiaron de tampón.

La solución de proteína concentrada se conservó tras filtración en condiciones de esterilidad en un recipiente de reacción de 1,5 ml a 4°C.

Determinación de la cantidad de proteína

Para la determinación de la concentración de proteína total de las muestras de proteínas concentradas se usó un ensayo de Lowry modificado (Lowry, O.H. y col. 1951) (ensayo Bio-Rad-DC-Protein).

Además de la determinación de proteína total se lleva a cabo con las muestras una electroforesis en gel SDS-PAGE con coloración por Coomassie subsiguiente del gel. Esto permitió una estimación mediante la proporción de la proteína recombinante purificada en la proteína total en la muestra.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Para la electroforesis en gel de proteínas se usaron exclusivamente geles gradientes en Tris-HCl de 4 a 15% lineales preparados previamente en la cámara de gel Ready Gel Cell (Bio-Rad) correspondiente. Después de 10' de ebullición de las muestras en tampones de muestra Roti-Load 4x no reducidos (compañía Roth) se aplicaron las muestras sobre

ES 2 292 587 T3

los geles. La electroforesis en gel en un tampón de elución Tris/glicina/SDS (BioRad) durante 0,6 h con 200 v a temperatura ambiente.

Transferencia Western

Realización según el procedimiento en tanque en una cámara Mini Trans-Blot-Cell (Bio-Rad) sobre membranas PVDF-Hybond (Amersham/Pharmacia). Condiciones de transferencia. 1,2 horas a 500 mA en tampón blot (Tris-base 25 mM; glicina 192 mM, pH 8,3; metanol al 20%).

Inmunocoloración de transferencias Western

La inmunocoloración de proteínas sometidas a transferencia western se llevó a cabo según procedimientos convencionales. La detección de las proteínas de fusión de GB se realizó con el anticuerpo Anti-Penta-His de Qiagen (1/5000 vol. En TTBS (1,4 g/l de base Tris; 6,05 g/l de Tris-HCl; 8,78 g/l de NaCl, pH 7,5; Tween 20 al 0,05%; BSA al 0,1%)). La detección se llevó a cabo con una IgG de burro-anti-ratón conjugada con HRP (Dianova) (1/10000 vol. en TTBS). Para la reacción de quimioluminiscencia final se usó el sistema ECL (Amersham Pharmacia) y se iluminó correspondientemente la película de rayos X (Roche).

Coloración con Coomassie de geles de SDS-PAGE

Se dispusieron los geles de SDS-PAGE en la solución de colorante (Coomassie Brilliant Blue R250 al 0,25%; metanol al 45%; ddH₂O al 45%; ácido acético al 10%) y se incubaron durante 1 h en un equipo agitador por rotación. Después se lavaron los geles de SDS-PAGE varias veces en una solución descolorante (metanol al 45%; ddH₂O al 45%; ácido acético al 10%) y a continuación se limpiaron con H₂O.

Caracterización in vitro de proteínas recombinantes

Análisis de FACS

La capacidad de unión de las construcciones KGB segregadas de las células transfectadas se determinó mediante citometría de flujo celular (Barth, S. y col. 1998). Las suspensiones celulares se lavaron brevemente con 2 x 10⁵ células en PBS/BSA/N₃ (PBS con BSA al 0,2% y azida sódica al 0,05%) y a continuación se incubaron con sobrenadantes de cultivo celular o apoptóticos de GB purificados en PBS/BSA/N₃ durante 30' a 4°C. Después de 3 lavados se incubaron las células durante 30' a 4°C con 1/1000 vol. de anti-Penta-His en PBS/ABS/azida. De nuevo se realiza lavado 3 veces de las células e incubación durante 15' con 1/50 vol. de FITC-cabra-anti-ratón Ak en PBS/BSA/azida. Después de otros 3 lavados en PBS/BSA/azida se adicionó a la suspensión celular 2 µl de yoduro de propidio 6,25 mg/ml y se analizó inmediatamente en un FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania).

Ensayos de viabilidad XTT

La determinación del potencial citotóxico de las proteínas de fusión de GB se determinó mediante la translocación de sustrato de sal de tetrazolio amarilla a células con colorante de formazán solubles en agua (Barth, S. y col 2000). La viabilidad relativa de las células se determinó a este respecto mediante controles positivos de células a las que se adiciona zeocina.

Se colocaron en placas de fondo plano de 96 pocillos respectivamente series de dilución de toxina o de sobrenadantes de cultivo celular en dos a cuatro preparaciones. A tal fin se dispusieron en cada pocillo de la primera serie 120 µl de sobrenadante; en los restantes pocillos de la serie de dilución 100 µl de medio complejo. Se pipetearon respectivamente 20 µl de la primera serie en la siguiente etapa de dilución (dilución 1:5). Control positivo: 120 µl de medio complejo con zeocina (de 100 a 200 µg/ml); control negativo, sólo medio complejo. Se pipetearon luego de 1 a 0,8 x 10⁴ células en 100 µl de medio complejo en las series de dilución y se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C en un armario de cultivo en CO₂ al 5%. Tras adición de 50 µl de XTT/PMS (concentración final de 0,3 mg y 0,383 ng) por pocillo y una incubación adicional de 4 a 48 horas de las células se realizó la medida fotométrica de la translocación de sustrato XTT como sustracción de OD_{450 nm} - OD_{650 nm} en un lector ELISA.

Resultados

PCR de granzima B

Además de las secuencias específicas de GB (letras mayúsculas) se incorporaron mediante el cebador puntos de corte de restricción para la clonación adicional en el producto de amplificación (xx-Gb-back: XbaI, XhoI; Gb-for: Cell II, BamHI)

xx-Gb-back: gcactcgagttctagaATCATCGGGGACATGAGGCCAAG

Gb-for: ttctgtctcagctagtttgatccGTAGCGTTTCATGGTTTTCTTTATC

El producto de PCR mostró la longitud esperada de 720 bp (figura 2).

Construcciones de plásmido

Todas las clonaciones de la GB se llevaron a cabo mediante Xho I y Cel II en los distintos plásmidos pMS disponibles. La verificación de las clonaciones se realizó mediante análisis de restricción específicos, de secuenciación de KGbII y de la detección inmunohistoquímica de KGbMH en el sobrenadante de células 293T transfectadas (por ejemplo, pMS-KGbMH y pMS-KGb II) (figura 3).

Secuenciación

Se llevó a cabo la primera secuenciación en función del producto de GB-PCR con los cebadores específicos de GB y se confirmó la secuencia de GB. Se determinó la secuencia de GB completa en base al plásmido pMS-KGb II. Para la secuenciación solapada en ambas direcciones se usaron respectivamente los cebadores específicos de GB (por ejemplo, xxGb-back; Gb-for) así como respectivamente un cebador resistente al plásmido, aproximadamente 100 bp 5' o 3' de los puntos de corte relevantes para la clonación. Esta secuenciación mostró una homología del 100% respecto a la secuencia de GB publicada por la base de datos de PubMed con el número de acceso NM_004131.

Expresión de las proteínas recombinantes

La expresión de los agentes apoptóticos se realizó exclusivamente en células eucarióticas (por ejemplo, 293T). La figura 4 muestra el resultado de una transferencia Western según un minipreparado de proteína.

Análisis de FACS

Para evaluar la capacidad de unión de los agentes apoptóticos de KGB expresados eucarióticamente se llevaron a cabo análisis de FACS sobre líneas celulares CD30(+) (por ejemplo, L540Cy) y CD30(-) (por ejemplo, IMR5). Sobre la línea celular negativa y los controles correspondientes no se pudo documentar coloración alguna de las células en FACS. La coloración de las células CD30(+) con los apoptóticos de KGB era por el contrario idéntica a la del control positivo con Ki4moAk (figura 5). Esto muestra la unión mediada por Ki-4 (scFv) de los apoptóticos de KGbMH y la falta de uniones inespecíficas en las células estudiadas.

*Ensayos de viabilidad XTT**Competición de KGbMH con Ki4-moAk*

Junto a los análisis de FACS se llevó a cabo una competición del KGbMH con el anticuerpo Ki-4 monoclonal sobre L540Cy. Además de un ensayo de viabilidad XTT sencillo con sobrenadantes de cultivo celular (KGb II) de células 293T transfectadas de forma estable, se dispuso una serie de dilución de Ki4-moAk (concentración de partida 40 µg/ml) en 100 µg de sobrenadante de cultivo celular que contiene KGbMH (KG+Ki4). El transcurso simétrico al nivel de las curvas de viabilidad en la figura 6 muestra que se puede bloquear KGbMH con éxito mediante Ki-4-moAK.

Sobrenadantes de células 293T transfectadas transitoriamente

El ensayo de viabilidad XTT con los sobrenadantes de cultivo celular de células 293T transfectadas transitoriamente sirvió de aclaración de distintas preguntas básicas:

- ¿Pueden las células humanas/eucarióticas producir y segregar un apoptótico potencialmente tóxico para ellas?
- ¿Es suficiente la capacidad de síntesis de apoptóticos de GB de células transfectadas para desarrollar un efecto citotóxico frente a las células diana y por tanto hace posible un uso potencialmente en terapia génica?
- ¿Hasta qué punto influye la incorporación en terminal C de epítopos marcadores (por ejemplo, Myc y His-Tag) en la funcionalidad de los apoptóticos de BG?
- ¿Es mermada la síntesis de agentes apoptóticos de GB por la síntesis simultánea del EGFP?

Cada 1 x 10⁵ células 293T se transfectaron respectivamente con 1 µg de plásmido de ADN y 3 µl de Transfast en una placa de 12 pocillos con TransFast. Se juntaron respectivamente 2 transfecciones independientes en paralelo. Se sometieron 72 horas después de la transfección los sobrenadantes de cultivo celular con respectivamente 120 µl a la primera etapa de dilución de un ensayo de viabilidad XTT (4 series / construcción). La medida se realizó 48 horas después de la adición de XTT/fenacina. La valoración del ensayo de viabilidad se representa en la figura 7.

Los resultados representados muestran que ni las modificaciones en terminales C efectuadas ni la expresión simultánea del gen reportero EGFP tienen una influencia reconocible sobre la funcionalidad o cantidad de los apoptóticos de GB segregados.

Se puede esperar además de los resultados que los plásmidos que codifican y segregan apoptóticos de GB pueden ser de uso potencial también en el marco de una terapia génica.

Además del ensayo de viabilidad XTT en L540Cy se llevaron a cabo también controles con la línea celular CD30-negativa IMR5. Aquí no se pudo observar efecto citotóxico alguno de los agentes apoptóticos de KGbMH sobre las células.

Determinación de CI_{50} de KGbMH

Tras la purificación de KGbMH de sobrenadantes de cultivo celular de células transfectadas con pMS-KGb II se sometió tras análisis de FACS, determinación de cantidad de proteína así como una estimación de pureza de la preparación con ayuda de un gel de Coomassie, a un ensayo de viabilidad XTT con L540Cy. La CI_{50} determinada en la figura 8 a partir de la evaluación gráfica de los datos se encuentra para el KGbMH en 7,5 ng/ml. Este orden de magnitud corresponde aproximadamente al de inmunotoxinas clásicas como, por ejemplo, Ki-4(scFv)-ETA'(3-6 ng/ml) (Barth, S. y col. 2000).

Referencias

Andrade, F., Roy, S., Nicholson, D., Thornberry, N., Rosen, A. y Casciola-Rosen, L. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 8(4): 451-60 (1998).

Baluna, R. y Vitetta, E. S. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* 37 (2-3): 117-132 (1997).

Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Galinski, E. A. y Engert, A. Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant proteins under stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 66(4): 1572-1579 (2000).

Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Klimka, A., Tawadros, S., Schnell, R., Diehl, V. y Engert, A. Ki-4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice. *Blood* 95: 3909-3914 (2000).

Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Tawadros, S., Schnell, R., Schinkothe, T., Diehl, V. y Engert, A. Ki.4 (scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice. *Blood* 95(12): 3909-14 (2000).

Barth, S., Huhn, M., Wels, W., Diehl, V. y Engert, A. Construction and *in vitro* evaluation of RFT5(scFv)-ETA', a new recombinant single-chain immunotoxin with specific cytotoxicity toward CD25+ Hodgkin-derived cell lines. *Int J Mol Med* 1(1): 249-256 (1998).

Battelli, M. G., Buonamici, L., Polito, L., Bolognesi, A. y Stirpe, F. Hepatotoxicity of ricin, saporin or a saporin immunotoxin: xanthine oxidase activity in rat liver and blood serum. *Virchows Arch* 427(5): 529-35 (1996).

Beaumelle, B., Bensammar, L. y Bienvenue, A. Selective translocation of the A chain of diphtheria toxin across the membrane of purified endosomes. *J Biol Chem* 267(16): 11525-11531 (1992).

Beresford, P. J., Xia, Z., Greenberg, A. H. y Lieberman, J. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation [fe de erratas publicada en *Immunity* 1999 Jun; 10 (6): a continuación 768]. *Immunity* 10(5): 585-94 (1999).

Bolognesi, A., Tazzari, P. L., Olivieri, F., Polito, L., Falini, B. y Stirpe, F. Induction of apoptosis by ribosome-inactivating proteins and related immunotoxins. *Int J Cancer* 68(3): 349-55 (1996).

Brenner, T., Steinberger, I., Soffer, D., Beraud, E., Ben-Nun, A. y Lorberboum-Galski, H. A novel antigen-toxin chimeric protein: myelin basic protein-pseudomonas exotoxin (MBP-PE 40) for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol Lett* 68(2-3): 403-10 (1999).

Bukovsky, J., Evans, A., Tartaglione, M. y Kennett, R. H. Selection of variant neuroblastoma cell line which has lost cell surface expression of antigen detected by monoclonal antibody P115313. *Somat Cell Mol Genet* 11(5): 51-72 (1985).

Chaudhary, V., Batra, J., Gallo, M., Willingham, M., Fitz, G. D. y Pastan, I. A rapid method of cloning functional variable-region antibody genes in *Escherichia coli* as single-chain immunotoxins [fe de erratas publicada en *Proc Natl Acad Sci USA* Abril de 1990: 87(8):3253]. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(3): p1066-70 (1990).

Chuahdary, V., Gallo, M., Fitz, G. D. y Pastan, I. A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(23): p9491-4 (1990).

Chaudhary, V., Queen, C., Junghans, R. Waldmann, T., Fitz, G. D. y Pastan, I. A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature* 339(6223): p384-7 (1989).

Chen, S., Yang, A., Chen, J., Kute, T., King, C., Collier, J., Cong, Y., Yao, C. y Huang, X. Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells. *Nature* 385(6611): p78-80 (1997).

Crowe, J., Dobeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stuber, D. y Henco, K. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* 31: 371-87 (1994).

Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. y Tsurugi, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J Biol Chem* 262(12): 5908-12 (1987).

Engert, A., Diehl, V., Schnell, R., Radszuhn, A., Hatwig, M. T., Drillich, S., Schon, G., Bohlen, H., Tesch, H., Hansmann, M. L., Barth, S., Schindler, J., Ghetie, V., Uhr, J. y Vitetta, E. A phase-I study of an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in patients with refractory Hodgkins lymphoma. *Blood* 89(2): 403-4 10 (1997).

Fernandes-Alnemri, T., Amstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G. y Alnemri, E. S. *In vitro* activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(15): 7464-9 (1996).

Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F. y Vallee, B. L. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24(20): 5480-6 (1985).

FitzGerald, D. J., Willingham, M. C. y Pastan, I. *Pseudomonas* exotoxinimmunotoxins. *Cancer Treat Res* 37: 161-173 (1988).

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W. C. y Naim, R. Characteristics of a human cell und transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1): 59-74 (1977).

Greenberg, A. H., Granzyme 8-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 406: 219-28 (1996).

Grossbard, M. L., Fidias, P., Kinsella, J., O'Toole, J., Lambert, J. M., Blattler, W. A., Esseltine, D., Braman, G., Nadier, L. M. y Anderson, K. C. Anti-B4-blocked ricin: a phase II trial of 7 day continuous infusion in patients with multiple myeloma. *BrJ Haematol* 102(2): 509-515 (1998).

Grossbard, M. L., Lambert, J. M., Goldmacher, V. S., Spector, N. L., Kinsella, J., Eliseo, L., Coral, F., Taylor, J. A., Blattler, W. A. y Epstein, C. L. Anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasms. *J Clin Oncol* 11(4): 726-737 (1993).

Harkonen, S., Stoudemire, J., Mischak, R., Spitler, L. E., Lopez, H. y Scannon, P. Toxicity and immunogenicity of monoclonal antimelanoma antibody-ricin A chain mmunotoxin in rats. *Cancer Res* 47(5): 1377-82 (1987).

Hochuli, V. Cholesterol testing for all [letter]. *Bmj* 298(6677): 891 (1989).

Iglewski, B. H. y Kabat, D. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(6): 2284-8 (1975).

Jans, D. A., Jans, P., Briggs, L. J., Sutton, V. y Trapani, J. A. Nuclear transport of granzyme B (fragmentin-2). Dependence of perforin *in vivo* and cytosolic factors *in vitro*. *J Biol Chem* 271 (48): 30781-9 (1996).

Jurcic, J. G. y Scheinberg, D. A. Radioimmunotherapy of hematological cancer: problems and progress. *Clin Cancer Res* 1(12): 1439-1446 (1995).

Kam, C. M., Hudig, D. y Powers, J. C. Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 307-23 (2000).

Kaminski, M. S., Zasadny, K. R., Francis, I. R., Fenner, M. C., Ross, C. W., Milik, A. W., Estes, J., Tuck, M., Regan, D., Fisher, S., Glenn, S. D. y Wahl, R. L. Iodine-131-anti-B1 radioimmunotherapy for B-cetl lymphoma. *J Clin Oncol* 14(7): 1974-1 981 (1996).

Kapp, U., Wolf, J., von Kalle, C., Tawadros, S., Rottgen, A., Engert, A., Fonatsch, C., Stein, H. y Diehl, V. Preliminary report: growth of Hodgkin's lymphoma derived cells in immune compromised mice. *Ann Oncol* 3 Suppl 4 :21-23 (1992).

- Keppler-Hafkemeyer, A., Brinkmann, U. y Pastan, I.** Role of caspases in immunotoxin-induced apoptosis of cancer cells. *Biochemistry* 37(48): 16934-16942 (1998).
- Keppler-Hafkemeyer, A., Kreitman, R. J. y Pastan, I.** Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies. *Int J Cancer* 87(1): 86-94 (2000).
- Khazaehi, M. B., Conry, R. M. y Lo Buglio, A. F.** Human immune response to monoclonal antibodies. *J Immunother* 15(1): 42-52 (1994).
- Klimka, A., Barth, S., Drillich, S., Wels, W., van Snick, J., Renaud, J. C., Tesch, H., Bohlen, H., Diehl, V. y Engert, A.** A deletion mutant of Pseudomonas exotoxin-A fused to recombinant human interleukin-9 (rhIL-9-ETA') shows specific cytotoxicity against IL-9-receptor-expressing cell lines. *Cytokines Mol Ther* 2(3): 139-146 (1996).
- Kreitman, R. J., Wilson, W. H., White, J. D., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E. S., Giardina, S., Waldmann, T. A. y Pastan, I.** Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 18(8): 1622-1636 (2000).
- Kuzel, T. M., Rosen, S. T., Gordon, L. I., Winter, J., Samuelson, E., Kaul, K., Roenigk, H. H., Nylen, P. y Woodworth, T.** Phase I trial of the diphtheria toxin/interleukin-2 fusion protein DAB486IL-2: efficacy in mycosis fungoides and other non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 11(5-6): 369-377 (1993).
- Leland, P. A., Schultz, L. W., Kim, B. M. y Raines, R. T.** Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(18): 10407-12 (1998).
- LeMaistre, C., Saleh, M., Kuzel, T., Foss, F., Platanias, L., Schwartz, G., Ratain, M., Rook, A., Freytes, C., Craig, F., Reuben, J. y Nichols, J.** Phase I trial of a ligand fusion-protein (DAB389IL-2) in lymphomas expressing the receptor for interleukin-2. *Blood* 91(2): p399-405 (1998).
- LeMaistre, C. F., Meneghetti, C., Rosenblum, M., Reuben, J., Parker, K., Shaw, J., Deisseroth, A., Woodworth, T. y Parkinson, D. R.** Phase I trial of an interleukin-2 (IL-2) fusion toxin (DAB486IL-2) in hematologic malignancies expressing the IL-2 receptor. *Blood* 79(10): 2547-2554 (1992).
- LoBuglio, A. F. y Saleh, M. N.** Monoclonal antibody therapy of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 13(3): 271-82 (1992).
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.** Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275 (1951).
- Matthey, B., Engert, A. y Barth, S.** Ki-4(scFv)-Ricin, a new recombinant immunotoxin targeting CD30 isolated from *E. coli* periplasmic space exhibits specific cytotoxic activity against Hodgkin cells *in vitro*. submitted (2000).
- Newton, D., Nicholls, P., Rybak, S. y Youle, R.** Expression and characterization of recombinant human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil-derived neurotoxin-anti-transferrin receptor sFv. *J Biol Chem* 269(43): p26739-45 (1994).
- Newton, D., Xue, Y., Olson, K., Fett, J. y Rybak, S.** Angiogenin single-chain immunofusions: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains. *Biochemistry* 35(2): p545-53 (1996).
- Newton, D. L., Ilercil, O., Laske, D. W., Oldfield, E., Rybak, S. M. y Youle, R. J.** Cytotoxic ribonuclease chimeras. Targeted tumoricidal activity *in vitro* and *In vivo*. *J Biol Chem* 267(27): 19572-8 (1992).
- Nicholson, D. W. y Thornberry, N. A.** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22(8): 299-306 (1997).
- O'Hare, M., Brown, A. N., Hussain, K., Gebhardt, A., Watson, G., Roberts, L. M., Vitetta, E. S., Thorpe, P. E. y Lord, J. M.** Cytotoxicity of a recombinant ricin-A-chain fusion protein containing a proteolytically-cleavable spacer sequence. *FEBS Lett* 273(1-2): 200-4 (1990).
- Pai, L. H. y Pastan, I.** Clinical trials with Pseudomonas exotoxin immunotoxins. *Curr Top Microbiol Immunol* 234: 83-96 (1998).
- Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Barry, M. y Bleackley, R. C.** Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis. *Cell Death Differ* 7(1): 17-24 (2000).
- Pirker, R.** Immunotoxins against solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 114(4): 385-93 (1988).
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. y Belfrage, G.** Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258(5536): 598-9 (1975).

- Press, O. W., Eary, J., Badger, C. C., Appelbaum, F. R., Wiseman, G., Matthews, O., Martin, P. J. y Bernstein, I. D.** High-dose radioimmunotherapy of lymphomas. *Cancer Treat Res* 68: 13-22 (1993).
- Rybak, S., Hoogenboom, H., Meade, H., Raus, J., Schwartz, D. y Youle, R.** Humanization of immunotoxins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(8): p3165-9 (1992).
- Rybak, S., Saxena, S., Ackerman, E. y Youle, R.** Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins. *J Biol Chem* 266(31): p21202-7 (1991).
- Saleh, M. N., Khazaeli, M. B., Wheeler, R. H., Dropcho, E., Liu, T., Urist, M., Miller, D. M., Lawson, S., Dixon, P., Russell, C. H. and et al.** Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma. *Cancer Res* 52(16): 4342-7 (1992).
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Nueva York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R.** DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12): 5463-5467 (1977).
- Sarin, A., Williams, M. S., Alexander-Miller, M. A., Berzofsky, J. A., Zacharchuk, C. M. y Henkart, P. A.** Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 6(2): 209-15 (1997).
- Saxena, S. K., Rybak, S. M., Davey, R. T. J., Youle, R. J. y Ackerman, E. J.** Angiogenin is a cytotoxic, tRNA-specific ribonuclease in the RNase A superfamily. *J Biol Chem* 267(30): 21982-21 986 (1992).
- Schnell, R., Vitetta, E., Schindler, J., Barth, S., Winkler, U., Borchmann, P., Hansmann, M. L., Diehl, V., Ghetie, V. y Engert, A.** Clinical trials with an anti-CD25 ricin A-chain experimental and immunotoxin (RFT5-SMPT-dgA) in Hodgkins Lymphoma. *Leuk Lymphoma* 30(5-6): 525-537 (1998).
- Schnell, R., Vitetta, E., Schindler, J., Borchmann, P., Barth, S., Ghetie, V., Heil, K., Drillich, S., Diehl, V. y Engert, A.** Treatment of refractory Hodgkin's Lymphoma patients with an anti-CD25 ricin A-chain immunotoxin. *Leukemia* 14(1): 129-135 (2000).
- Shapiro, R., Riordan, J. F. y Vallee, B. L.** The characteristic ribonuclease activity of angiogenin. *Biochem. Insert* 25: 3527-3532 (1986).
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A. y Ley, T. J.** How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10(5): 581-7 (1998).
- Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Zangrilli, J., Robertson, N., Armstrong, R. C., Wang, L., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G. y Alnemri, E. S.** The Ced-3/interleukin 1 beta converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2alpha are substrates for the apoptotic mediator CPP32. *J Biol Chem* 271 (43): 27099-106 (1996).
- Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A. y Trapani, J. A.** Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation [In Process Citation]. *J Exp Med* 192(10): 1403-14 (2000).
- Thorpe, P. E., Wallace, P. M., Knowles, P. P., Relf, M. G., Brown, A. N., Watson, G. J., Blakey, D. C. y Newell, D. R.** Improved antitumor effects of immunotoxins prepared with deglycosylated ricin A-chain and hindered disulfide linkages. *Cancer Res* 48(22): 6396-6403 (1988).
- Trapani, J. A., Jans, O. A., Jans, P. J., Smyth, M. J., Browne, K. A. y Sutton, V. R.** Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *J Biol Chem* 273(43): 27934-8 (1998).
- Trapani, J. A., Jans, P., Smyth, M. J., Froelich, C. J., Williams, E. A., Sutton, V. R. y Jans, D. A.** Perforin-dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction. *Cell Death Differ* 5(6): 488-96 (1998).
- Vitetta, E. S.** Immunotoxins and vascular leak syndrome [In Process Citation]. *Cancer J Sci Am* 6 Suppl 3: páginas 218-224 (2000).
- Yokota, T., Milenic, D. E., Whitlow, M. y Schlom, J.** Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms. *Cancer Res* 52(12): 3402-3408 (1992).

ES 2 292 587 T3

Yoon, J. M., Han, S. H., Kown, O. B., Kim, S. H., Park, M. H. y Kim, B. K. Cloning and cytotoxicity of fusion proteins of EGF and angiogenin. *Life Sci* 64(16): 1435-1445 (1999).

5 **Youle, R. J. y Neville, D. M. J.** Anti-Thy 1.2 monoclonal antibody linked to ricin is a potent cell-type-specific toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 77(9): 5483-5486 (1980).

Zewe, M., Rybak, S., Dubel, S., Coy, J., Welschhof, M., Newton, D. y Little, M. Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion. *Immunotechnology* 3(2): páginas 127-36 (1997).

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Proteína de fusión recombinante formada por al menos un componente A y al menos un componente B, **carac-**
terizada porque el componente A es una actividad de unión para estructuras de superficie celulares y el componente
 B es una granzima.

2. Proteína de fusión según la reivindicación 1, que contiene además de los componentes A y B uno o varios
 componentes S suplementarios.

3. Proteína de fusión según las reivindicaciones 1 y/o 2, **caracterizada** porque el componente A se selecciona del
 grupo de estructuras de unión activas, compuesto por anticuerpos o sus derivados o fragmentos, péptidos sintéticos
 o moléculas químicas, ligandos, lectinas, moléculas de unión al receptor, citocinas, linfocinas, quimiocinas, molé-
 culas de adhesión y sus derivados, mutantes o combinaciones de los mismos, que se unen a antígenos de grupo de
 diferenciación, receptores de citocinas, hormonas, del factor de crecimiento, bombas de iones, proteínas que forman
 canales.

4. Proteína de fusión según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** porque el componente A se selecciona
 del grupo de estructuras de unión pasiva compuesto por alérgenos, alérgenos peptídicos, alérgenos recombinantes,
 anticuerpos alergenidiotípicos, estructuras que provocan una reacción autoinmune o inducen una reacción de rechazo
 de tejidos y sus derivados, mutantes o combinaciones de los mismos.

5. Proteína de fusión según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada** porque el componente B posee propiedades
 proteolíticas o es al menos una proteasa, sus derivados, mutante o combinación.

6. Proteína de fusión según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque el componente B activa directamente
 componentes de la apoptosis inherente a la célula y por tanto induce la apoptosis en las células definidas mediante la
 unión del componente A.

7. Proteína de fusión según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque el componente B es la granzima B o
 un derivado de la misma.

8. Proteína de fusión según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque un componente S regula la capacidad
 de síntesis.

9. Proteína de fusión según la reivindicación 8, **caracterizada** porque el componente S asegura la purificación del
 complejo o de sus componentes.

10. Proteína de fusión según las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizada** porque el componente S facilita la translo-
 cación en las células diana.

11. Proteína de fusión según las reivindicaciones 7 a 10, **caracterizada** porque el componente S hace posible una
 activación intracelular del componente B.

12. Moléculas de ácido nucleico o vectores que codifican una proteína de fusión según la reivindicación 11.

13. Organismos, excepto humanos, **caracterizados** porque con ellos se realizó una transformación o transfección
 con moléculas de ácido nucleico o vectores según la reivindicación 12 y porque estos sintetizan proteínas de fusión
 según la reivindicación 1.

14. Medicamentos que contienen una proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 11 o moléculas de
 ácido nucleico según la reivindicación 12.

15. Uso de la proteína de fusión según una de las reivindicaciones 1 a 11 y/o las moléculas de ácido nucleico que
 codifican esta según la reivindicación 12 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades
 malignas, alergias, reacciones autoinmunes, reacciones inflamatorias crónicas o reacciones de rechazo de tejidos.

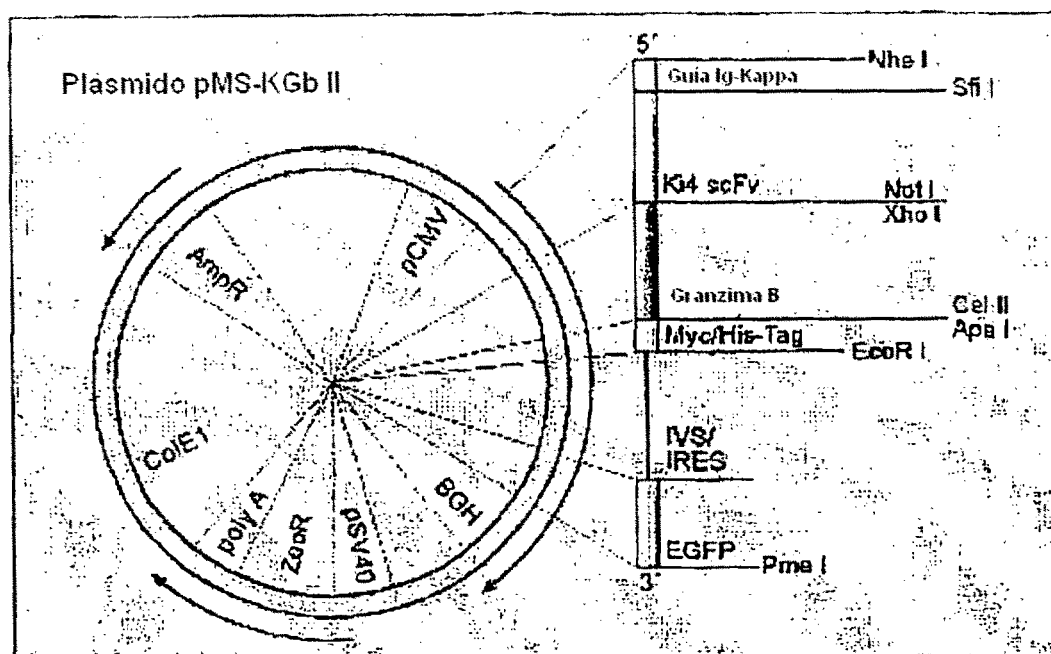


Figura 1: plásmido pMS-KGb II

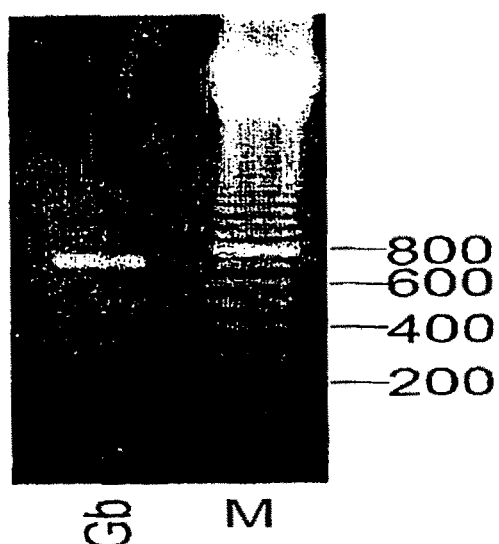


Figura 2: producto de Gb-PCR tras amplificación en el ADNc humano

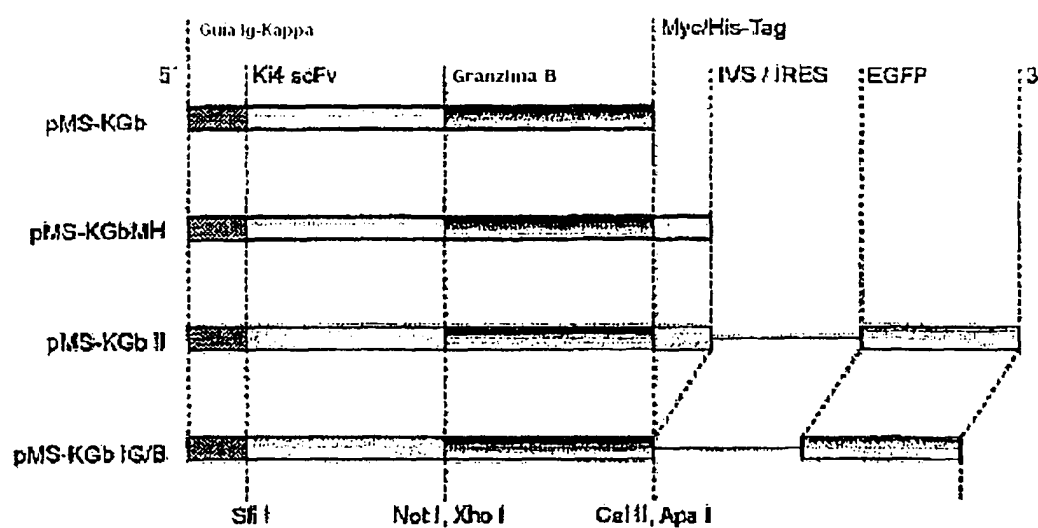


Figura 3: comparación de los distintos transcritos de los plásmidos pMS. Están representadas las respectivas regiones traducidas (barras) y la región IVS/IRES no traducida de ARNm

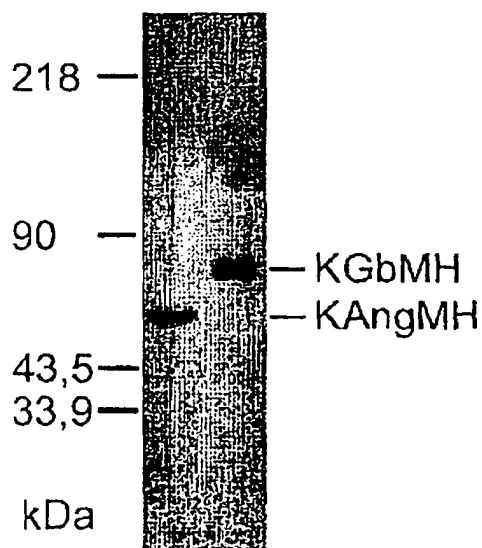


Figura 4: transferencia western de minipreparados de proteína de sobrenadantes de cultivo celular de células 293T transfectadas transitoriamente. La altura de las bandas se corresponde con el tamaño calculado de aprox. 60 kDa. (Control kAngMH: aprox. 50 kDa).

Sobrenadante de kGbII sobre L540Cy

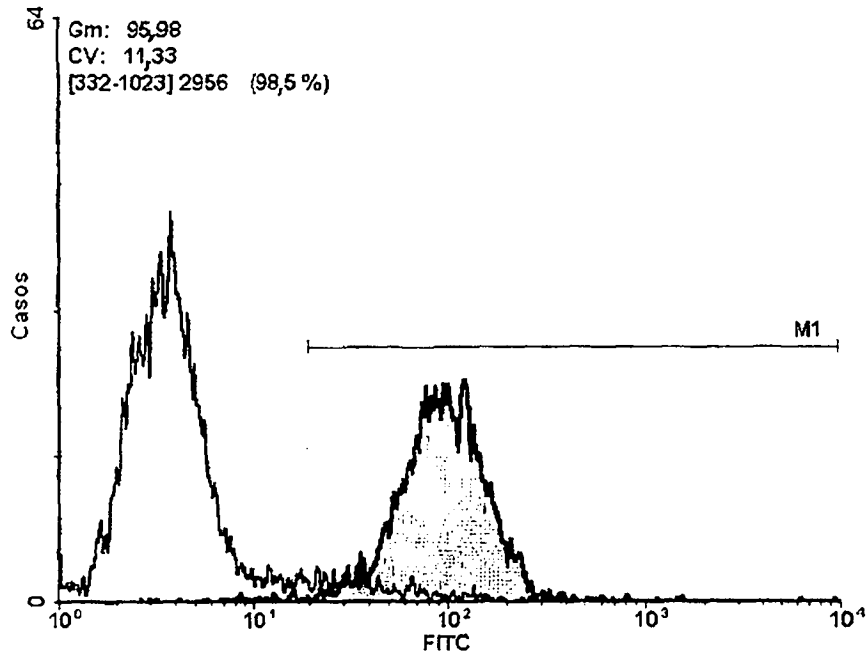


Figura 5: evaluación del análisis de FACS de KGBMH en la línea celular L540Cy. El 98,5% de las células L540Cy son positivas en comparación con el control negativo (sin incubar sobrenadante de cultivo celular).

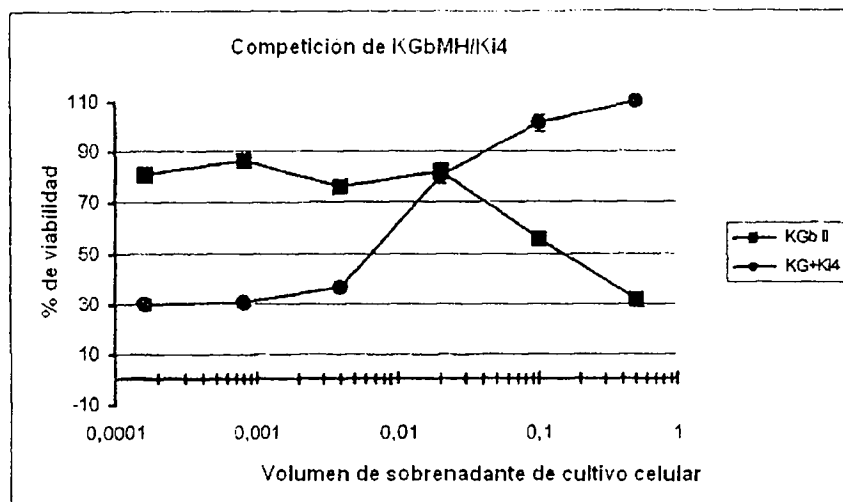


Figura 6: competición de anticuerpos Ki4 monoclonales con sobrenadantes de cultivo celular de células 293T transfectadas con KGb II.

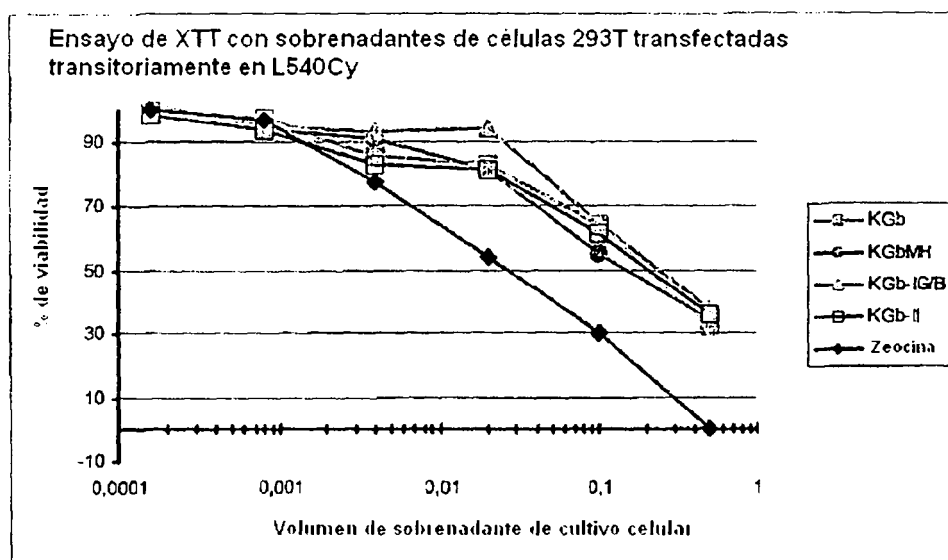


Figura 7: efecto citotóxico de sobrenadantes de cultivo celular que contienen apoptóticos de GB de células 293T transfectadas transitoriamente en la línea celular de Hodgkin L540Cy.

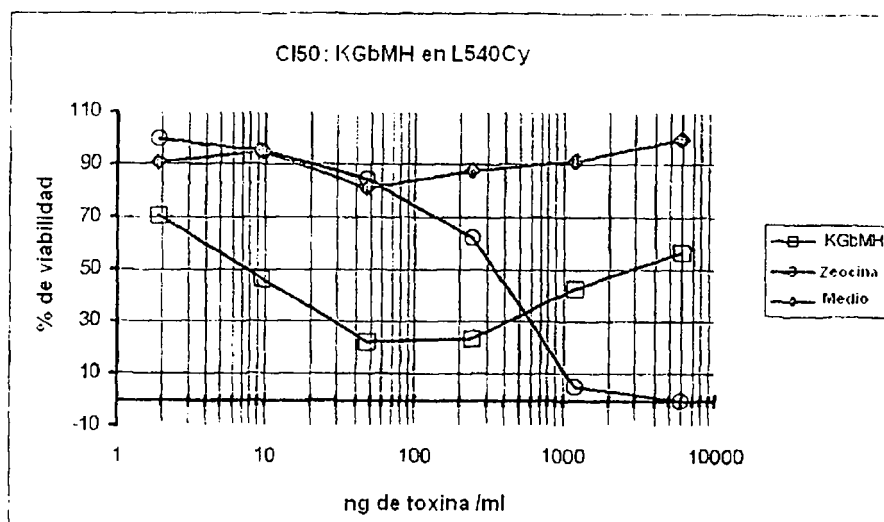


Figura 8: determinación de CI₅₀ de KGBMH purificado en la línea celular L540Cy

ES 2 292 587 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Barth, Stefan Engert, Andreas Stöcker, Michael	
	<120> Agentes apoptóticos	
10	<130> 010582wo	
	<140> PCT/EP/01/04514	
	<141> 2001-04-20	
15	<150> DE10020095.8	
	<151> 2000-04-22	
20	<160> 2	
	<170> PatentIn ver. 2.1	
25	<210> 1	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia sintética	
30	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia sintética: cebador xx-Gb-back para la clonación	
35	<400> 1	
	gcactcgagt ctagaatcat cgggggacat gaggccaag	39
40	<210> 2	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia sintética	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia sintética: cebador Gb-for para la clonación	
50	<400> 2	
	ttcgtgctca gctagtttgg atccgtagcg ttcatgggtt ttcttttacc	40
55		
60		
65		