(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 289 775**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/16 (2006.01)
C07K 14/68 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **98913218 .8**
(86) Fecha de presentación : **27.03.1998**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0975354**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2000**

(54) Título: **Composiciones de ligando/péptido lítico y métodos de uso.**

(30) Prioridad: **27.03.1997 US 41009 P**
04.06.1997 US 869153
03.09.1997 US 57456 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

(73) Titular/es: **Board of Supervisors of Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College**
c/o Louisiana Agricultural Experiment Station
Room 104F, LSU Agriculture Center Building
P.O. Box 25055
Baton Rouge, Louisiana 70895-5055, US

(72) Inventor/es: **Enright, Frederick, M.;**
Jaynes, Jesse, M.;
Hansel, William;
Koonce, Kenneth, L.;
McCann, Samuel, M.;
Yu, Wen, H.;
Melrose, Patricia, A.;
Foil, Lane, D. y
Elzer, Philip, H.

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Composiciones de ligando/péptido lítico y métodos de uso.

Se reivindica el beneficio de la fecha de presentación del 27 de marzo de 1997 de la solicitud provisional de número de serie 60/041.009 y de la fecha de presentación del 3 de septiembre de 1997 de la solicitud provisional 60/057.456, bajo el Título 35 del U.S.C. § 119(e) en los Estados Unidos, y se reivindica bajo los tratados y convenciones aplicables fuera de los Estados Unidos. Se reivindica el beneficio de la fecha de presentación del 4 de junio de 1997 de la solicitud no provisional de Estados Unidos 08/869.153 bajo el Título 35 del U.S.C. § 120 en los Estados Unidos, y se reivindica bajo los tratados y convenciones aplicables fuera de los Estados Unidos.

Campo técnico

Esta invención está relacionada con el uso de compuestos para inhibir de forma específica células que están controladas por, o dependen de, interacciones con ligandos específicos.

Técnica antecedente

La siguiente discusión aparece en la página 37: "Se pueden unir toxinas específicas a un anticuerpo u hormona y llevarlas a una célula (o células) específica seleccionada como objetivo, que después es destruida por la toxina. La idea de desarrollar una "bala mágica" se ha discutido durante décadas, pero actualmente está adquiriendo un reconocimiento renovado como método potencial y sumamente selectivo para destruir tejidos específicos a la vez que permanecen intactos otros tejidos. Durante muchos años fue imposible desarrollar grandes cantidades de anticuerpos que reaccionasen de forma específica solamente con determinantes antigénicos únicos. Sin embargo, con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, se ha superado en gran medida este problema. Se pueden desarrollar anticuerpos hacia receptores hormonales específicos (tales como el receptor de LH) y después acoplarlos a una toxina. De esa manera se deberían destruir todas las células con receptores de LH. Aunque no se han caracterizado los diversos tipos celulares en cuerpos lúteos de perro, la destrucción de cualquier tipo celular luteínico podría dar como resultado potencialmente la luteólisis si los tipos celulares se comunican" (citas omitidas).

T. Janaky *et al*., "Short Chain Analogs of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Containing Cytotoxic Moieties", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 89, págs. 10203-10207 (1992) describe el uso de ciertos análogos de hexapéptidos y heptapéptidos de GnRH como portadores para ciertas mostazas de nitrógeno alquilantes, ciertos derivados de antraquinona, antimetabolitos y complejos de platino similares a cisplatino. Los autores informaron que varios de los compuestos ejercieron efectos citotóxicos sobre la línea celular de cáncer de mama MCF-7.

D. Fitzgerald *et al*., "Targeted Toxin Therapy for the treatment of Cancer", J. Natl. Cancer Inst., vol. 81, págs. 1455-1463 (1989), revisó las terapias con toxinas dirigidas para el cáncer, que incluyen conjugar toxinas tales como exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de difteria y ricina a una proteína de unión a células, tal como un anticuerpo monoclonal o un factor de crecimiento. Los conjugados se interiorizan después hacia el citoplasma, en el que la toxina interrumpe la actividad celular.

Las terapias convencionales con toxinas dirigidas tienen diversas desventajas. Existe un intervalo pequeño para el tratamiento con una toxina dirigida particular (del orden de dos semanas) antes de que el sistema inmunitario del receptor prepare una respuesta con anticuerpos hacia la toxina dirigida. Estos anticuerpos neutralizarán la toxina; o, aún peor, pueden dar como resultado el depósito de la toxina en los tejidos reticuloendoteliales (p. ej., hígado, bazo, nódulos linfáticos, pulmones, médula ósea), en los que puede dañar el tejido sano. Además de esta desventaja, la toxina debe ser interiorizada por la célula seleccionada como objetivo y translocada hacia el citoplasma para que tenga efecto.

Una aproximación relacionada es unir un anticuerpo monoclonal a una enzima. Este conjugado se dirige de forma específica a un antígeno de superficie de una célula tumoral. Después se administra un profármaco al paciente. El profármaco es sustancialmente menos tóxico que el fármaco que resulta de la activación del fármaco en el sitio tumoral mediante la enzima conjugada. El fármaco activado ataca después de forma selectiva a las células tumorales. Véase, p. ej., D. Kerr *et al*., "Regressions and Cures of Melanoma Xenografts following treatment with Monoclonal Antibody β-Lactamase Conjugates in Combination with Anticancer Prodrugs", Cancer Research, vol. 55, págs. 3558-3563 (1995); y H. Svensson *et al*., "*In Vitro* and *In Vivo* Activities of a Doxorubicin Prodrug in Combination with Monoclonal Antibody β-Lactamase Conjugates", Cancer Research, vol. 55, págs. 2357-2365 (1995).

S. Sealfon *et al*., "Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor", Endocrine Reviews, vol. 18, págs. 180-205 (1997) proporciona una revisión de la investigación acerca de la interacción entre GnRH y su receptor.

F. Hu *et al*., "Theophylline and Melanocyte-Stimulating Hormone Effects on Gamma-Glutamyl Transpeptidase and DOPA Reactions in Cultured Melanoma Cells", J. Investigative Dermatology, vol. 79, págs. 57-61 (1982) describió que la teofilina y la hormona estimulante de melanocitos (MSH) incrementaban la pigmentación en células de melanoma murino, aparentemente mediante mecanismos diferentes. J. Murphy *et al*., "Genetic Construction, Expression, and Melanoma-Selective Cytotoxicity of a Diphtheria Toxin-Related α-Melanocyte-Stimulating Hormone

Fusion Peptide", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 83, págs. 8258-8262 (1986) describe la actividad selectiva *in vitro* contra células de melanoma mediante un conjugado MSH-toxina de difteria. Véase también D. Bard, "An Improved Imaging Agent for Malignant Melanoma, Based on [Nle4, D-Phe7]α-Melanocyte Stimulating Hormone", Nucl. Med. Comm., vol. 16, págs. 860-866 (1995).

W. Siegrist *et al*., "Homologous and Heterologous Regulation of α-Melanocyte-Stimulating Hormone Receptors in Human and Mouse Melanoma Cell Lines", Cancer Research, vol. 54, págs. 2604-2610 (1994) informa que está bien establecido que las células de melanoma humano poseen receptores específicos de elevada afinidad para α-MSH. Véase también J. Tatro *et al*., "Melanotropin Receptors Demonstrated *In Situ* in Human Melanoma", J. Clin. Invest., vol. 85, págs. 1825-1832 (1990).

P. Bacha *et al*., "Thyrotropin-Releasing Hormone-Diphtheria Toxin-related Polypeptide Conjugates", J. Biol. Chem., vol. 258, págs. 1565-1570 (1983) describe conjugados de hormona liberadora de tirotropina (TRH) con dos toxinas de difteria; uno de estos conjugados provocó una inhibición del 50% de la síntesis proteica en células hipofisarias GH_3 de rata a una concentración 3 x 10^{-9} M. Véase también P. Bacha *et al*., "Organ-Specific Binding of a Thyrotropin-Releasing Hormone-Diphtheria Toxin Complex after Intravenous Administration to Rats", Endocrinology, vol. 113, págs. 1072-1076 (1983).

V. Chaudhary, "Activity of a Recombinant Fusion Protein between Transforming Growth Factor Type α and Pseudomonas toxin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, págs. 4538-4542 (1987) describe que una proteína de fusión de una toxina modificada de *Pseudomonas* y un tipo de factor de crecimiento transformante destruye de forma selectiva las células que expresan receptores de factor de crecimiento epidérmico. Véase también D. Cawley *et al*., "Epidermal Growth Factor-Toxin A Chain Conjugates: EGF-Ricin Is a Potent Toxin while EGF-Diphtheria Fragment A is Nontoxic", Cell, vol. 22, págs. 563-570 (1980).

E. Vitetta *et al*., "Redesigning Nature's Poisons to Create Anti-Tumor Reagents", Science, vol. 238, págs. 1098-1104 (1987) revisa el uso de inmunotoxinas contra los tumores. También se menciona el uso en la prevención de reacciones de injerto contra hospedador. Los autores mencionaron que la eficacia *in vivo* fue menor de lo deseable. Las dificultades mencionadas incluyeron la accesibilidad de las toxinas de la circulación a las células seleccionadas como objetivo; la inestabilidad de la unión de la toxina al anticuerpo; el aclaramiento rápido de las inmunotoxinas de la circulación por el hígado; la respuesta del sistema inmunitario del receptor hacia la toxina o hacia el anticuerpo monoclonal, lo que complicaba la terapia a largo plazo; la posible falta de especificidad por las células neoplásicas renovadas; la reactividad cruzada con las células normales; la heterogeneidad de las células tumorales; y la eliminación de los antígenos de superficie de las células tumorales.

P. Trail *et al*., "Antigen-specific Activity of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Conjugates Evaluated *in Vitro* and in Human Tumor Xenograft Models", Cancer Research, vol. 52, págs. 5693-5700 (1992) describe la conjugación del anticuerpo anticarcinoma BR64 a un derivado de doxorrubicina, y discute los efectos antitumorales del conjugado.

J. Olson, "Laboratory Evidence for the Hormonal Dependency of Meningiomas", Human Reproduction, vol. 9, supl. 1, págs. 195-201 (1994) describe la evidencia de que los meningiomas, tumores intracraneales benignos, poseen receptores de progesterona.

S. Prigent *et al*., "The Type 1 (EGFR-Related) Family of Growth Factor Receptors and their Ligands", Progress in Growth Factor Research, vol. 4, págs. 1-24 (1992) revisa la biología del factor de crecimiento epidérmico (EGF), su receptor y los ligandos y receptores relacionados (p. ej., c-erbB-2, c-erbB-3, TGFα, anfiregulina, heregulina), y sus papeles en la proliferación celular normal y en la patogénesis del cáncer humano. Véase también D. Davies *et al*., "Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor for Therapy of Carcinomas", Biochem. Pharm., vol. 51, págs. 1101-1110 (1996).

D. Morbeck *et al*., "A Receptor Binding Site Identified in the Region 81-95 of the β-Subunit of Human Luteinizing Hormone (LH) and chorionic gonadotropin (hCG)", Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 97, págs. 173-181 (1993) describió una región de quince aminoácidos de LH y hCG que actuó como un sitio de unión al receptor (LH y hCG son hormonas homólogas que producen efectos similares).

W. Theunis *et al*., "Luteinising Hormone, Follicle Stimulating Hormone and Gonadotropin Releasing Hormone Immunoreactivity in Two Insects: Locusta migratoria migratoroides R & F and Sarcophaga bullata (Parker)", Invert. Reprod. and Develop., vol. 16, págs. 111-117 (1989) describió que los materiales inmunológicamente relacionados con LH, FSH y GnRH se localizaron en el tejido cerebral de *Locusta migratoria* y *Sarcophaga bullata*. Véase también P. Verhaert *et al*., "Substances Resembling Peptides of the Vertebrate Gonadotropin System Occur in the Central Nervous System of Periplaneta americana L.", Insect Biochem., vol. 16, págs. 191-197 (1986).

Las patentes de EE.UU. Nºs 5.378.688; 5.488.036; y 5.492.893 describen compuestos supuestamente útiles para inducir la esterilidad en mamíferos, y para tratar ciertos tumores relacionados con las hormonas sexuales en mamíferos. Los compuestos descritos se describieron de forma genérica como GnRH (o un análogo de GnRH) conjugada a una toxina. La toxina se unió preferiblemente al sexto aminoácido del agonista de GnRH. La toxina fue preferiblemente una con un dominio de translocación para facilitar la absorción hacia la célula. Los inventores indicaron que la conjugación del agonista de GnRH a la toxina "es necesaria porque, en su mayoría, las toxinas anteriores, por sí

solas, no son capaces de unirse a las membranas celulares en general. Es decir, los solicitantes han descubierto que solamente cuando un análogo de GnRH del tipo descrito aquí se une a una toxina del tipo indicado anteriormente, esa toxina se hace capaz de unirse a las membranas celulares...” (p. ej., la pat. Nº 5.488.036, col. 7, líneas 46-52). Las toxinas específicamente mencionadas parecen haber sido todas toxinas metabólicas, por ejemplo ricina, abrina, modeccina, diversas proteínas inhibidoras de los ribosomas derivadas de vegetales, proteína antiviral de fitolaca, α-amanitina, toxina de difteria, exotoxina de pseudomonas, toxina Shiga, melfalán, metotrexato, mostaza de nitrógeno, doxorrubicina y daunomicina. No se cree que ninguna de estas toxinas sea tóxica debido a la interacción directa con la membrana celular. En los experimentos *in vivo* informados, el tratamiento más eficaz informado consistió en inyecciones semanales durante 4 semanas (p. ej., pat. 5.488.036, col. 20, líneas 46-47). Debido a que la mayoría de los conjugados citados son compuestos relativamente grandes, la antigenicidad podría ser un problema cuando se usan tales administraciones múltiples. El análogo de GnRH se unió preferiblemente a la toxina con uno de los diversos reactivos heterobifuncionales especificados. Las memorias descriptivas sugieren que se realizaron esfuerzos considerables para conjugar la toxina con el agonista de GnRH. Las toxinas en general se deben interiorizar en las células seleccionadas como objetivo para que tengan efecto, y no actúan en las membranas celulares; además, al menos algunas de estas toxinas se deben transportar de forma secundaria desde la vesícula unida a la membrana hacia el citoplasma para interaccionar con los ribosomas, las mitocondrias u otros componentes celulares.

M. Kovacs *et al*., “Recovery of pituitary function after treatment with a targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 94, págs. 1420-1425 (1997) describe que un análogo de doxorrubicina conjugado con un agonista de LH-RH (es decir, GnRH) atacó de forma selectiva a las células con receptores de LH-RH, y que su efecto sobre las células hipofisarias fue reversible. El artículo sugiere que se podría usar el conjugado para tratar tumores con receptores de LH-RH. Véase también A. Jungwirth et al., “Regression of rat Dunning R-3227-H prostate carcinoma by treatment with targeted cytotoxic analog of luteinizing hormone-releasing hormone AN-207 containing 2-pyrrolinodoxorubicin”, Intl. J. Oncol., vol. 10, págs. 877-884 (1997).

R. Moretti *et al*., “Luteinizing hormone-releasing hormone agonists interfere with the stimulatory actions of epidermal growth factor in human prostatic cancer cell lines, LNCaP and DU 145”, J. Clin. Endocrin. & Metab., vol. 81, págs. 3930-3937 (1996) describe que los agonistas de la hormona liberadora de LH inhiben las líneas celulares de cáncer prostático humano dependientes de andrógenos (LNCaP) e independientes de andrógenos (DU 145), y sugiere que los agonistas pueden inhibir la proliferación de las células tumorales interfiriendo con las acciones estimuladoras del factor de crecimiento epidérmico.

I. Mezô *et al*., “Synthesis of GnRH analogs having direct antitumor and low LH-releasing activity”, J. Med. Chem., vol. 40, págs. 3353-3358 (1997) describe agonistas y antagonistas de GnRH-I de gallina. Se informó que el agonista MI-1892 tiene una actividad endocrinológica baja, pero posee actividad antitumoral.

A. Nechushtan *et al*., “Adenocarcinoma cells are targeted by the new GnRH-PE66 chimeric toxin through specific gonadotropin-releasing hormone binding sites”, J. Biol. Chem., vol. 272, págs. 11597-11603 (1997) describe el uso de una exotoxina de *Pseudomonas* acoplada a GnRH para destruir ciertos tipos de células cancerosas.

X. Zhu, “Steroid-independent activation of androgen receptor in androgen-independent prostate cancer. A possible role for the MAP kinase signal transduction pathway?” Mol. & Cell. Endocrinol., vol. 134, págs. 9-14 (1997) describe que los receptores de andrógenos en el cáncer de próstata se podrían activar en ausencia de la señal de andrógeno.

G. Emons *et al*., “Growth-inhibitory actions of analogues of luteinizing hormone releasing hormone on tumor cells”, Trends in Endocrin. Metab., vol. 8, págs. 355-362 (1997) revisa las similitudes y diferencias entre los receptores de GnRH de las células cancerosas y de las células normales del cerebro y de la hipófisis; y sugiere que los análogos de LHRH interfieren con la transducción de la señal mitógena de los receptores de factores de crecimiento y de los productos de oncogenes relacionados asociados a la actividad de la tirosina quinasa en varios tumores malignos humanos, que incluyen tumores de mama, ovario, endometrio y próstata.

D. Tang *et al*., “Target to Apoptosis: A Hopeful Weapon for Prostate Cancer”, The Prostate, vol. 32, págs. 284-293 (1997) proporciona una revisión de la investigación sobre la apoptosis como vía para tratar los tumores de próstata.

A. Goustin *et al*., “Growth Factors and Cancer”, Cancer Research, vol. 46, págs. 1015-1029 (1986) proporciona una visión de conjunto de diversos factores de crecimiento que se han asociado a diferentes cánceres.

S. Cho *et al*., “Evidence for autocrine inhibition of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene transcription by GnRH in hypothalamic GT1-1 neuronal cells”, Mol. Brain Res., vol. 50, págs. 51-58 (1997) describe que las poblaciones neuroendocrinas de neuronas de GnRH tienen receptores de elevada afinidad para GnRH y para análogos de GnRH.

S. Sower *et al*., “Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain”, Endocrinology, vol. 132, págs. 1125-1131 (1993) describe la estructura de GnRH-III de lamprea.

E. Stopa *et al*., “Immunocytochemical evidence for a lamprey-like gonadotropin-releasing hormone in human brain”, Soc. Neurosci. Abstr., resumen nº 437.8, pág. 1577 (1987) describe que se halla una GnRH-III similar a la de lamprea en humanos.

S. White *et al*., "Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 92, págs. 8363-8367 (1995); y J. Powell *et al*., "Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species", Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol. 91, págs. 12081-12085 (1994) son ejemplos de artículos que informan de la presencia típica de tres formas de GnRH en especies de vertebrados.

J. Warnock *et al*., "Anxiety and mood disorders associated with gonadotropin-releasing hormone agonist therapy", Psychopharmacology Bull., vol. 33, págs. 311-316 (1997) informa que el tratamiento crónico con un agonista de GnRH puede ir acompañado de efectos secundarios psicológicos.

L. Deligdisch *et al*., "Pathological changes in gonadotropin releasing hormone agonist analogue treated uterine leiomyomata", Fertility and Sterility, vol. 67, págs. 837-841 informó de cambios patológicos asociados al tratamiento de leiomiomas con un análogo de GnRH para inducir la menopausia iatrogénica.

J. Fuerst *et al*., "Effect of active immunization against luteinizing hormone-releasing hormone on the androgen-sensitive Dunning R3327-PAP and Androgen-Independent Dunning R3327-AT2.1 prostate cancer sublines", Prostate, vol. 32, págs. 77-84 (1997) informó que la inmunización activa de ratas con un conjugado LHRH-toxoide de difteria provocó la atrofia de testículos, próstata y tumores de próstata sensibles a andrógenos, con una inhibición de los tumores provocada por la supresión de la división celular, más que por un incremento de la muerte celular; y que el incremento del volumen de los tumores de próstata independientes de andrógenos se redujo ligeramente.

C. Mantzoros *et al*., "Insulin-like growth factor 1 in relation to prostate cancer and benign prostatic hyperplasia", Br. J. Cancer, vol. 76, págs. 1115-1118 (1997) informó que las concentraciones incrementadas de factor de crecimiento similar a insulina 1 estuvieron asociadas a un riesgo incrementado de cáncer de próstata.

V. Ding, "Sex hormone-binding globulin mediates prostate androgen receptor action via a novel signaling pathway", Endocrinology, vol. 139, págs. 213-218 (1998) informó que las rutas independientes de andrógenos pueden activar la progresión de ciertos cánceres de próstata.

J. King *et al*., "Evolution of gonadotropin-releasing hormones", Trends in Endocrin. Metab., vol. 3, págs. 339-344 (1992) describe las estructuras primarias de diferentes GnRHs de diversos vertebrados. Véase también J. King *et al*., "Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization", J. Biol. Chem., vol. 257, págs. 10729-10732 (1982).

N. Mores *et al*., "Activation of LH receptors expressed in GnRH neurons stimulates cyclic AMP production and inhibits pulsatile neuropeptide release", Endocrinology, vol. 137, págs. 5731-5734 (1996) describe que LH actúa directamente sobre las neuronas neuroendocrinas del cerebro. Véase también Z. Lei *et al*., "Signaling and transacting factors in the transcriptional inhibition of gonadotropin releasing hormone gene by human chorionic gonadotropin in immortalized hypothalamic GT1-7 neurons", Mol. & Cell. Endocrinology, vol. 109, págs. 151-157 (1995).

Las patentes de Estados Unidos 5.597.945 y 5.597.946 describen plantas transformadas con genes que codifican diversos péptidos líticos.

Descripción de la invención

Se ha descubierto inesperadamente que los péptidos líticos anfipáticos son especialmente adecuados para usarlos en una combinación ligando/citotoxina para inhibir de forma específica células anormales o normales que están controladas por, o dependen de, la interacción con un ligando específico; por ejemplo, para atacar células tumorales. Los péptidos actúan directamente sobre las membranas celulares, y no necesitan ser interiorizados.

La administración *in vivo* de una combinación de un ligando y un péptido lítico activo en la membrana destruye las células que tienen un receptor para el ligando. Los compuestos usados en la presente invención son relativamente pequeños, y no serán antigénicos (se sabe que los péptidos líticos no son muy antigénicos; y los ligandos no son antigénicos en absoluto). Los compuestos se pueden administrar en una dosis única, o en dos o más dosis en un corto espacio de tiempo.

La lisis de las células tumorales es rápida. Los dos componentes (el ligando y el péptido lítico) se pueden administrar opcionalmente en forma de un péptido de fusión, o se pueden administrar por separado, con el ligando administrado un poco antes del péptido lítico, para activar las células con receptores para el ligando, y por lo tanto hacer que esas células sean susceptibles a la lisis mediante el péptido lítico. Si se usa un péptido de fusión, se ha descubierto inesperadamente que no es necesario un resto de unión para unir el ligando al péptido lítico: el uno se puede unir directamente al otro sin necesidad de ninguna unión intermedia; la unión se puede realizar uniendo un extremo del ligando a un extremo del péptido, o mediante unión en el medio de cada uno. La toxina, el péptido lítico, no necesita un dominio de translocación, y no necesita ser interiorizado, ya que se une y actúa directamente en la membrana celular activada para provocar la lisis. El ligando puede ser un compuesto nativo completo, o puede ser en vez de ello el dominio de unión solamente; este último se prefiere cuando el ligando completo es relativamente grande.

Los compuestos de la presente invención son adecuados para el uso en terapia génica para tratar tumores malignos o benignos y otras enfermedades provocadas por clones o poblaciones de células hospedadoras "normales" que albergan receptores específicos (tales como linfocitos), ya que se pueden insertar fácilmente los genes que codifican un péptido lítico o que codifican una proteína de fusión péptido lítico/hormona peptídica en células pluripotenciales hematopoyéticas o en células precursoras mieloides.

Modos para llevar a cabo la invención

Diversas células cancerosas (uterinas, endometriales, prostáticas, testiculares y ováricas) expresan receptores de LH o hCG. Tao *et al*., "Expression of Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor Gene in Benign Prostatic Hyperplasia and in Prostatic Carcinoma in Humans", Biol. Reprod., vol. 56, págs. 67-72 (1997). Así, se pueden usar conjugados de un péptido lítico y LH o una porción de la molécula de LH para destruir estas células de manera selectiva. Por ejemplo, se conocen los genes que codifican hormonas tales como FSH, TRH y LH, y se pueden unir a una secuencia de ADN que codifica un péptido lítico para producir un péptido de fusión secretado, todo bajo el control de un promotor adecuado, tal como los promotores sensibles de fase aguda descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos de n.s. 08/474.678, presentada el 7 de junio de 1995, y en la solicitud PCT WO 95/01095, publicada el 12 de enero de 1995. Se puede usar un sitio de unión de una hormona en lugar de la hormona entera, por ejemplo el sitio de unión de quince aminoácidos de LH y hCG. Véase D. Morbeck *et al*., "A Receptor Binding Site Identified in the Region 81-95 of the β-Subunit of Human Luteinizing Hormone (LH) and chorionic gonadotropin (hCG)", Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 97, págs. 173-181 (1993).

Un vector potente que es adecuado para transformar las células a usar en la terapia génica es el vector basado en transposón que se describe en el documento de Estados Unidos 5.719.055.

Se sabe que la forma de D-aminoácidos de GnRH se unirá a las células gonadotropas de la hipófisis, a las neuronas de GnRH del cerebro y a diversos tipos de células cancerosas. También se sabe que las formas de D-aminoácidos de los péptidos líticos tienen esencialmente la misma propensión a lisar las membranas celulares que las formas de L-aminoácidos. Los compuestos de la presente invención (administrados en forma de un péptido de fusión o por separado) se pueden administrar por lo tanto en forma L o en forma D. Los péptidos en forma D, aunque generalmente son más caros que en forma L, tienen la ventaja de que no se degradan mediante los procesos enzimáticos normales, por lo que los péptidos en forma D se pueden administrar por tanto oralmente, y en general tienen una semivida biológica más larga. La administración oral del péptido en forma D se puede mejorar uniendo el producto de fusión péptido/hormona a un portador adecuado para facilitar la absorción en el intestino, por ejemplo vitamina B_{12}, siguiendo en general la técnica de conjugación con B_{12} de G. Russell-Jones *et al*., "Synthesis of LHRH Antagonists Suitable for Oral Administration via the Vitamin B_{12} Uptake System", Bioconjugate Chem., vol. 6, págs. 34-42 (1995).

Se pueden usar análogos de GnRH o GnRH (colectivamente, "agonistas de GnRH") en la presente invención. Se ha informado que las sustituciones en las posiciones 6 y 10 del decapéptido de GnRH pueden producir "superagonistas" que tienen una afinidad de unión mayor al receptor de GnRH que la que tiene la propia GnRH. Estos "superagonistas" incluyen goserelina, leuprolida, buserelina y nafarelina. Véase la pat. de EE.UU. nº 5.488.036.

Sin desear limitarse por esta teoría, se cree que un mecanismo (aunque no el mecanismo exclusivo) que subyace en la esterilización/anticoncepción a largo plazo es el siguiente: GnRH activa las células gonadotropas de la hipófisis, así como las neuronas de GnRH neuroendocrinas del cerebro. Las células activadas tienen una susceptibilidad sustancialmente incrementada a la lisis por un péptido lítico. Después, el péptido lítico destruye de forma preferente (o daña gravemente) estas células activadas. Cuando las células gonadotropas de la hipófisis se destruyen y se les priva de la GnRH del cerebro, la hipófisis ya no secreta hormona estimulante del folículo (FSH) u hormona luteinizante (LH), por lo que se deja al animal estéril de forma temporal o permanente.

Aunque el ligando y el péptido lítico se pueden administrar por separado, se prefiere unir los dos en una única molécula, porque tal unión incrementa enormemente la concentración eficaz del péptido lítico en la proximidad de las células activadas por el ligando. Además, este incremento de la concentración eficaz del péptido lítico puede evitar la necesidad de activación de las células, lo que permite que el péptido se una a un sitio de unión de un ligando por sí solo, sin la necesidad de incluir el "resto" de un ligando nativo que normalmente sería necesario para activar las células seleccionadas como objetivo. Esta unión puede ser en cualquier orden: por ejemplo, GnRH/péptido o péptido/GnRH. Son ejemplos GnRH modificada/hecate (ID SEC Nº 3) y hecate/GnRH modificada (ID SEC Nº 4). Nótese que no es necesaria ninguna molécula de unión intermedia, y que el extremo carboxilo de uno de los dos péptidos puede estar unido directamente al extremo amino del otro (se ha descubierto que el residuo inicial de ácido piroglutámico de GnRH o de la porción de GnRH de un péptido de fusión se puede sustituir con glutamina sin cambiar de manera sustancial la actividad de los péptidos respectivos. Véanse, p. ej., las ID SEC Nºs 9, 3 y 4).

Resultados experimentales

Ejemplos 1-6

Se recogió la hipófisis de una rata adulta hembra y se dividió en seis cortes de aproximadamente el mismo tamaño. Se colocó un corte en cada uno de seis pocillos que contenían medio de cultivo de tejidos a 37ºC. Se aplicó un tratamiento diferente a cada pocillo tal como se describe a continuación. Diez horas después del tratamiento se fijó el tejido de cada pocillo, y se examinó microscópicamente la histología de cada uno.

El *Tratamiento 1* aplicó medio de cultivo de tejidos solamente como control. La histología de este tejido después del tratamiento pareció normal.

El *Tratamiento 2* fue una aplicación de 5 nanogramos de GnRH (ID SEC Nº 1) por mL de medio. La histología de este tejido después del tratamiento fue normal; se notó un pequeño grado de vacuolización celular. Como comparación, la concentración de GnRH en ratas normales sin tratar varía de valores bajos tales como 1 ng/mL hasta valores elevados tales como 20 ng/mL durante la fase del pico de LH del ciclo de celo.

El *Tratamiento 3* fue una aplicación de 50 μM del péptido lítico hecate (ID SEC Nº 2) en el medio. La histología de este tejido tras el tratamiento pareció normal.

El *Tratamiento 4* fue una aplicación inicial de 5 nanogramos de GnRH por mL de medio durante 15 minutos. Después de esta incubación, se eliminó el medio que contenía GnRH, y el tejido se lavó una vez con medio solo. Este medio se eliminó después y se sustituyó por medio que contenía 50 μM del péptido lítico hecate. Se observó destrucción celular basófila (células gonadotropas) generalizada tras este tratamiento.

El *Tratamiento 5* fue una aplicación de 50 μM del péptido de fusión GnRH modificada/hecate (ID SEC Nº 3). Se observó destrucción celular basófila (células gonadotropas) generalizada tras el tratamiento.

El *Tratamiento 6* fue una aplicación inicial del péptido de fusión GnRH/hecate (ID SEC Nº 3), seguida de una segunda aplicación del péptido de fusión GnRH/hecate dos horas más tarde. Después del tratamiento el tejido estaba virtualmente destruido y solamente quedaban las células estromales.

Ejemplo 7

Se administraron dos inyecciones intravenosas de solución salina de control con una diferencia de 24 horas a dos ratas hembra sexualmente inmaduras de la misma camada (de 33 días de edad). Después de que las ratas alcanzasen la edad de reproducción, se examinaron 105 días tras la inoculación. Los genitales externos parecieron normales. Durante un periodo de monitorización de catorce días desde el día 107 hasta el día 121 tras la inoculación, cada una de las ratas de control completó al menos dos ciclos de celo. Las ratas se sacrificaron después y se realizó la necropsia. Los órganos reproductores parecieron histológicamente normales.

Ejemplo 8

Se administraron dos inyecciones intravenosas de 500 μg de péptido de fusión GnRH/hecate en solución salina con una diferencia de 24 horas a dos ratas hembra sexualmente inmaduras de la misma camada que las del Ejemplo 7 (de 33 días de edad). Después de que las ratas alcanzasen la edad de reproducción, se examinaron 105 días tras la inoculación. Los genitales externos parecieron pequeños. A diferencia de las ratas de control, la inserción de una torunda con punta de algodón en la vagina fue difícil. Durante un periodo de monitorización de catorce días desde el día 107 hasta el día 121 tras la inoculación, ninguna de las ratas tratadas mostró estro o metaestro. Las ratas se sacrificaron después y se realizó la necropsia. Las ratas tratadas con péptido tuvieron epitelios uterinos y oviductales disminuidos e inactivos. Los ovarios no contuvieron folículos grandes, y tuvieron un número elevado de folículos atrésicos (es decir, aquellos que no habían ovulado).

Ejemplos 9-14

Dieciocho ratas hembra sexualmente maduras mezcladas se asignaron aleatoriamente a uno de seis grupos que contenían tres ratas cada uno. Cada grupo de ratas recibió un tratamiento doble de forma intravenosa, como se describe más adelante. Dos semanas después del tratamiento se sacrificaron las ratas y se realizó la necropsia. Se seccionaron, pesaron y examinaron histológicamente los órganos reproductores y endocrinos.

El *Tratamiento 9* fue un control de solución salina. Las ratas de este grupo exhibieron una función ovárica normal (p. ej. folículos normales y cuerpos lúteos nuevos). Las hipófisis de este grupo fueron de tamaño normal. La histología mostró un número normal de células basófilas hipofisarias.

El *Tratamiento 10* fue una inyección con un total de 1,0 mg de péptido de fusión GnRH/hecate en solución salina, dividido en dos inyecciones iguales de 0,5 mg administradas con una diferencia de 24 horas. Las ratas de este grupo mostraron una interrupción del desarrollo folicular ovárico normal. Hubo presentes pocos cuerpos lúteos, y aquellos que estaban presentes parecían viejos. Los folículos eran grandes y no se habían roto. La morfología uterina fue coherente con la inactividad hormonal. Las hipófisis de este grupo fueron ligeramente menores que las hipófisis del grupo de control de solución salina. La histología reveló una reducción del 60% al 70% en el número de células basófilas hipofisarias comparado con los controles.

El *Tratamiento 11* fue una inyección de 100 μL de una disolución 1,35 mM de GnRH (162 μg) en solución salina, seguida 15 minutos más tarde por una inyección con 100 μL de una disolución 1,35 mM de hecate (337 μg) en solución salina. Se repitió el mismo tratamiento en dos etapas 24 horas más tarde. Las ratas de este grupo mostraron una histología ovárica alterada. Hubo presentes pocos cuerpos lúteos, y aquellos que estuvieron presentes parecían viejos. Los folículos eran grandes y no se habían roto. La morfología uterina fue coherente con la inactividad hormonal. Las hipófisis y la histología hipofisaria fueron similares a las observadas en el Tratamiento 10.

El *Tratamiento 12* fue una inyección de 100 μL de una disolución 1,35 mM de hecate (337 μg) en solución salina. El tratamiento se repitió después de 24 horas. Las ratas de este grupo exhibieron una función ovárica normal (p. ej., folículos normales y cuerpos lúteos nuevos). Las hipófisis y la histología hipofisaria fueron similares a las observadas en el Tratamiento 9.

El *Tratamiento 13* fue una inyección de 100 μL de una disolución 1,35 mM de GnRH (162 μg) en solución salina. El tratamiento se repitió después de 24 horas. Las ratas de este grupo exhibieron una función ovárica normal (p. ej. folículos normales y cuerpos lúteos nuevos). Las hipófisis y la histología hipofisaria fueron similares a las observadas en el Tratamiento 9.

El *Tratamiento 14* fue idéntico al Tratamiento 10, excepto en que el péptido de fusión GnRH/hecate se purificó adicionalmente mediante HPLC. Las ratas de este grupo mostraron una interrupción del desarrollo folicular ovárico normal. Hubo presentes pocos cuerpos lúteos, y aquellos que estuvieron presentes parecían viejos. Los folículos fueron grandes y no se habían roto. La morfología uterina fue coherente con la inactividad hormonal. Las hipófisis y la histología hipofisaria fueron similares a las observadas en el Tratamiento 10.

Estos experimentos demuestran que GnRH y el péptido lítico se pueden administrar por separado o en forma de un péptido de fusión, aunque se prefiere el péptido de fusión ya que se espera que sea más activo a dosis más bajas.

Aunque los experimentos para determinar las dosis óptimas no se han realizado hasta el momento en el que esta solicitud se está presentando, una persona de experiencia habitual en la técnica, a la que se le proporcionan las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, puede determinar fácilmente las dosis óptimas por medio de ensayos rutinarios.

Aunque los experimentos hasta la fecha se han realizado en animales hembra, se esperan resultados similares para animales macho, porque GnRH indica a las células hipofisarias la liberación de gonadotropinas tanto en machos como en hembras.

La especificidad tisular y celular de los conjugados citotóxicos se puede aumentar adicionalmente usando diversas hormonas o análogos de hormona acoplados a un péptido lítico. A continuación se proporcionan algunos ejemplos ilustrativos. Para el control de la fertilidad, tanto la hipófisis como el componente neuronal de GnRH central del eje reproductor se dañan de forma selectiva mediante un conjugado GnRH-hecate. Pocas células del sistema nervioso central deberían ser dañadas por este tratamiento, porque las formas de GnRH-II de gallina y GnRH-III de lamprea son las moléculas principales que afectan a la función cerebral en la mayoría de los mamíferos. El control de la fertilidad se puede conseguir también de forma selectiva tratando a los animales con un conjugado bLH-hecate; este compuesto debería afectar específicamente a las neuronas de GnRH que controlan la reproducción y las gónadas. Para seleccionar como objetivo células tumorales prostáticas, mamarias, ováricas o endometriales, se debería usar el conjugado 1-LHRH-III-hecate, ya que se une a receptores de las células cancerosas, y no tiene ninguna acción significativa conocida en el cerebro (se pueden usar otros péptidos líticos en lugar de hecate en estos conjugados).

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar como se describen, o en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las composiciones se pueden administrar de forma intravenosa, subcutánea, intramuscular u oral (especialmente cuando están en forma de D-aminoácidos, preferiblemente complejadas con un portador, p. ej., vitamina B_{12}).

Ejemplos 15-22

Se asignaron aleatoriamente ocho ratas hembra Sprague-Dawley sexualmente maduras a uno de ocho tratamientos. Cada grupo de ratas recibió un único tratamiento de forma intravenosa, como se describe más adelante. Se sacrificaron las ratas y se realizó la necropsia 48 o 96 horas después del tratamiento. Se fijaron los ovarios, útero, páncreas, hígado, bazo, pulmones, corazón, tiroides y glándulas adrenales en un 10% de formalina tamponada; se realizaron cortes; y se tiñeron con tinción H&E (hematoxilina y eosina); salvo que las hipófisis se tiñeron con tinción PAS (ácido peryódico-Schiff) sin tinción de contraste. Se seleccionaron los tratamientos de forma que cada animal recibió una cantidad equimolar del compuesto con el que fue tratado.

Los *tratamientos 15 y 16* fueron una inyección IV de 674 μg de D-hecate en 200 μL de solución salina (1,35 mM). La rata del tratamiento 15 se sacrificó 48 horas tras la inyección, y la rata del tratamiento 16 se sacrificó 96 horas tras la inyección. No se observaron lesiones macroscópicas en los órganos de ningún animal. Las hipófisis de ambas ratas contuvieron un número normal de células positivas a PAS.

Los *tratamientos 17 y 18* fueron una inyección IV de 334 μg de GnRH en 200 μL de solución salina (1,35 mM). La rata del tratamiento 17 se sacrificó 48 horas tras la inyección, y la rata del tratamiento 18 se sacrificó 96 horas tras la inyección. No se observaron lesiones macroscópicas en los órganos de ningún animal. Las hipófisis de ambas ratas contuvieron un número normal de células positivas a PAS.

Los *tratamientos 19-22* fueron una inyección IV de 1 mg de péptido de fusión GnRH-hecate (ID SEC Nº 3) en 100 μL de solución salina (2,7 mM). Las ratas de los tratamientos 19 y 20 se sacrificaron 48 horas tras la inyección, y las ratas de los tratamientos 21 y 22 se sacrificaron 96 horas tras la inyección. No se observaron lesiones macroscópicas en los órganos de ninguno de los cuatro animales, que no fueran la hipófisis. Las hipófisis de los animales de los tratamientos 19 y 20 estaban ligeramente agrandadas, hiperémicas y edematosas. Las hipófisis de los animales de los tratamientos 21 y 22 eran ligeramente hiperémicas, pero del tamaño esperado. Las hipófisis de las cuatro ratas mostraron una disminución marcada de las células positivas a PAS; se estimó que la disminución fue del 80 al 90% comparado con los grupos de control (la tinción PAS tiñe preferentemente glicopéptidos. LH, FSH, TSH y MSH son hormonas glicopeptídicas; las células que contienen estas hormonas almacenadas en sus vacuolas secretoras se tiñen positivamente con PAS).

Se observó así que la combinación GnRH-péptido lítico provocó alteraciones morfológicas y funcionales en el sistema reproductor de ratas hembra adultas y evitó la madurez sexual en ratas hembra prepuberales, y que el péptido de fusión eliminó de forma selectiva una población específica de células con tinción positiva a PAS de la hipófisis.

Ejemplo 23

Hecate es un péptido lítico anfipático que actúa sobre las membranas celulares sin ser interiorizado. Es un péptido sintético análogo de melitina, la toxina principal del veneno de abeja. Se cree que hecate actúa alterando las membranas celulares. La estructura del conjugado GnRH modificada-hecate usado en estos estudios fue la de la ID SEC Nº 3.

También se sintetizó D-Lys^{6}GnRH (ID SEC Nº 13), de forma que se pudo conjugar hecate a la D-Lys^6, una posición que podría minimizar la interferencia con la unión del dominio de GnRH al receptor de GnRH. Estos péptidos sintéticos desplazaron específicamente GnRH monoyodado radiomarcado de membranas hipofisarias de rata. El desplazamiento mediante D-Lys^{6}GnRH-hecate fue comparable a (y realmente ligeramente mayor que) el desplazamiento mediante GnRH nativa de mamífero, medido mediante cpm de radiactividad. Cuando se comparó la unión de GnRH y GnRH-hecate basándose en cantidades molares a lo largo de un intervalo de concentración de 1000 veces (n = 6), el GnRH-hecate desplazó específicamente al péptido radiomarcado en una medida igual al 123% ± 4% de la unión exhibida por concentraciones equimolares de GnRH; las concentraciones equimolares de D-Lys^{6}GnRH desplazaron un 187% ± 8% de las cpm desplazadas por la GnRH nativa.

Ejemplos 24-31

Se estudió la lisis *in vitro* de células luteínicas bovinas con conjugado GnRH-hecate y con conjugado hecate-bLH (ID SEC Nº 12) (el componente bLH del conjugado es un fragmento de 15 monómeros de la cadena beta de la hormona luteinizante, ID SEC Nº 11). Las células luteínicas pequeñas se recogieron de cuerpos lúteos de ganado tras el sacrificio. Las células luteínicas pequeñas son ricas en receptores de LH, y se descubrió que eran sumamente susceptibles a la lisis mediante el conjugado hecate-bLH.

Las células luteínicas pequeñas en cultivo se incubaron con uno de los siguientes tratamientos durante 22 horas, y después se examinó la viabilidad mediante exclusión con azul Trypan y liberación de lactato deshidrogenasa.

Tratamiento 24 de control: sin tratamiento adicional (medio solo)

Tratamiento 25: 10 ng de bLH (control positivo)

Tratamiento 26: hecate-bLH, 10 μM

Tratamiento 27: hecate-bLH, 5 μM

Tratamiento 28: hecate-bLH, 1 μM

Tratamiento 29: hecate (solo), 10 μM

Tratamiento 30: hecate (solo), 5 μM

Tratamiento 31: hecate (solo), 1 μM

Se observó una destrucción significativa de células luteínicas pequeñas después de 22 h de incubación con hecate 10 μM solo y con hecate 5 μM solo (aproximadamente un 50% de células destruidas). La muerte celular para hecate 1 μM solo no difirió significativamente del control negativo (medio) o de bLH solo. Las tres dosis de tratamiento con hecate-bLH provocaron incrementos significativos de muerte celular comparado con el tratamiento con hecate solo. El conjugado hecate-bLH destruyó aproximadamente dos veces el número de células que fueron destruidas mediante hecate solo a las mismas concentraciones.

Los niveles observados de actividad de lactato deshidrogenasa también demostraron que el tratamiento con hecate-bLH destruyó un número de células significativamente mayor que con hecate solo.

Ejemplos 32-33

Se estudió también la lisis *in vitro* de células granulosas bovinas con conjugado GnRH-hecate y con conjugado hecate-bLH. Las células granulosas se aislaron de folículos preovulatorios bovinos (las células granulosas son células activas hormonalmente con numerosos receptores de LH). Los experimentos con células granulosas fueron por otra parte similares en general a los descritos anteriormente para los Ejemplos 24-31. Estos experimentos demostraron (1) que las células granulosas fueron mucho más susceptibles a la destrucción mediante hecate solo de lo que lo fueron las células luteínicas pequeñas, y (2) que, como fue el caso con las células luteínicas pequeñas, las células granulosas fueron significativamente más susceptibles a hecate-bLH incluso a la concentración más baja (1 μM) de lo que lo fueron a hecate solo. A 1 μM, el conjugado hecate-bLH destruyó aproximadamente dos veces el número de células seleccionadas como objetivo que con hecate solo. De nuevo, los niveles de lactato deshidrogenasa liberada tras el tratamiento con hecate-bLH 1 μM fueron significativamente superiores que los niveles de enzima liberada tras el tratamiento con hecate 1 μM solo.

Los estudios adicionales (datos no mostrados) demostraron que un fragmento de 15 monómeros de la subunidad bLH se unió de forma específica a los receptores de LH en las células granulosas seleccionadas como objetivo, pero no inició la producción de hormonas esteroideas que sería indicativa de una respuesta acoplada a estímulo. Se demostró así que la destrucción selectiva de las células seleccionadas como objetivo se dio como resultado de la proximidad física del péptido lítico a la célula, que estuvo provocada por la unión de la subunidad de LH. La estimulación de la producción de hormonas en la célula seleccionada como objetivo no fue necesaria para la lisis celular. Este resultado fue sorprendente, ya que se había esperado previamente que la activación de las células seleccionadas como objetivo fuera necesaria para una susceptibilidad incrementada a la lisis. Estos datos demuestran que no es necesaria tal activación. Estos datos son, sin embargo, coherentes con otros datos que demuestran que la activación celular también es una ruta que puede llevar a una susceptibilidad incrementada al péptido lítico.

Ejemplos 34-37

Se realizó otro grupo de experimentos para estudiar los efectos *in vivo* del conjugado GnRH-hecate en ratas y conejos hembra. Se procesaron los ovarios, útero, oviductos, glándulas adrenales, bazo, tiroides, páncreas, hígado, pulmones y corazón para el análisis histológico. Se procesaron las hipófisis para el análisis histológico de células teñidas con PAS y para células teñidas inmunocitoquímicamente para bLH, BFSH (hormona bovina estimulante del folículo), hormona corticotropina y otros productos peptídicos de proopiomelanocortina (en particular hormona estimulante de melanocitos α (MSH)), hormona estimulante del tiroides (TSH), prolactina (PRL), vasopresina (VP), oxitocina (OXY) u hormona de crecimiento (GH). Los procedimientos de tinción inmunocitoquímica que se usaron siguieron en general los procedimientos de M. Rahmanian *et al*., "Histological and immunocytochemical characterization of pituitary cell types in ponies", Proc. 13th Soc. Equine Nutrition & Phys. Symp., págs. 348-349 (1993); M. Rahmanian *et al*., "Immunocytochemical localization of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the equine pituitary", J. Anim. Sci., vol. 76, págs. 839-846 (1998); M. Rahmanian *et al*., "Immunocytochemical localization of prolactin and growth hormone in the equine pituitary", Animal Sci., vol. 75, págs. 3010-3018 (1997); y P. Melrose *et al*., "Comparative topography of the immunoreactive alpha-melanocyte-stimulating hormone neuronal system in the brains of horses and rats", Brain Beh. & Evol., vol. 32, págs. 226-235 (1988).

Los cerebros se cortaron en serie en un Vibrotome desde el nivel de la banda diagonal de Broca hasta el cuerpo mamilar. Los cortes alternos se dividieron consecutivamente en cuatro a cinco placas, y los cortes de las placas alternas se tiñeron con violeta de cresilo, o se tiñeron inmunocitoquímicamente para GnRH o el precursor de GnRH, VP, OXY o tirosina hidroxilasa (la enzima limitante de la velocidad en la síntesis de catecolaminas). Además de los procedimientos de tinción citados anteriormente, también se usaron los procedimientos de tinción inmunocitoquímica de P. Melrose *et al*., "Distribution and morphology of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the basal forebrain of ponies", J. Comp. Neurol. vol. 339, págs. 269-287 (1994); y P. Melrose *et al*., "Topography of oxytocin and vasopressin neurons in the forebrain of Equus caballus: Further support of proposed evolutionary relationships for proopiomelanocortin, oxytocin and vasopressin neurons", Brain, Beh. & Evol., vol. 33, págs. 193-204 (1989).

Se dieron administraciones intravenosas a ratas hembra sexualmente inmaduras de treinta y tres días de edad como sigue:

Tratamiento 34: 0,03 μg de GnRH (una dosis fisiológica normal) (dos ratas)

Tratamiento 35: 1,62 μg de GnRH (el equivalente molar a la cantidad de GnRH del Tratamiento 36) (una rata)

Tratamiento 36: 0,5 mg de GnRH-hecate (una rata)

Tratamiento 37: 0,03 μg de GnRH, seguido 11 minutos más tarde por 0,337 μg de hecate (dos ratas).

Los animales se sacrificaron 14 días tras el tratamiento. Comparado con los dos grupos de control de GnRH, el tratamiento con GnRH-hecate y el tratamiento con GnRH seguido de hecate solo redujo los pesos de las hipófisis en un 13% y un 14%, respectivamente, y redujo el número de células gonadotropas específicas de bLH en un 92% y un 87%, respectivamente. Además, tras estos dos tratamientos experimentales, los cuerpos celulares de las neuronas teñidas para GnRH en las áreas hipofisiotropas del cerebro estuvieron deformados con frecuencia; y una cantidad sustancial de material inmunorreactivo se filtró hacia las áreas circundantes en donde estaban concentrados numerosos cuerpos celulares (el órgano vasculoso de la lámina terminal). Existió daño histológico en las células de los dos tratamientos experimentales en las áreas C1 y C3 del hipocampo, y una tinción incrementada de las neuronas de VP parvocelulares en el núcleo paraventricular (la tinción de VP puede haber estado provocada por la formación de un precipitado en ciertas áreas del cerebro. Los estudios posteriores con péptido más puro no mostraron un precipitado). El cambio en la expresión de VP, probablemente en las neuronas liberadoras de corticotropina, puede provocar un cambio en el procesamiento postraduccional de los productos peptídicos de proopiomelanocortina en la parte distal, ya que los tratamientos con GnRH-hecate y GnRH + hecate redujeron las concentraciones de hormona corticotropina e incrementaron el número de células teñidas para α-MSH en esta subdivisión de la hipófisis. No se notaron cambios patológicos en ninguno de los otros tejidos.

Ya que las neuronas del cerebro no se regeneran, el daño grave a estas neuronas podría hacer que la esterilización con una combinación GnRH/péptido lítico fuera permanente (pero temporalmente reversible mediante la administración de hormonas gonadotropas).

Ejemplos 38-42

Se inyectó de forma intravenosa solución salina o GnRH-hecate en solución salina a ratas hembra (asignadas aleatoriamente en grupos de tres) sexualmente inmaduras (de 33 días de edad) como sigue:

Tratamiento 38: 0,0 mg de GnRH-hecate

Tratamiento 39: 0,1 mg de GnRH-hecate

Tratamiento 40: 0,5 mg de GnRH-hecate

Tratamiento 41: 1,0 mg de GnRH-hecate

Tratamiento 42: 1,5 mg de GnRH-hecate.

Los animales se sacrificaron a las 24 horas o a los 14 días tras el tratamiento. Los resultados fueron similares a los informados anteriormente para los Ejemplos 34-37, excepto en que no se halló precipitado en el cerebro, y la tinción de VP en el SNC no se alteró. Los tratamientos con niveles mayores de GnRH-hecate produjeron un gran número de neuronas que contenían receptor de GnRH que tenían morfologías anormales, que incluían la distorsión de la parte somática de las células, y la degeneración de las neuritas. En las ratas sacrificadas catorce días tras el tratamiento, un 66% y un 87% de las neuronas que contenían receptor de GnRH fueron anormales en las ratas que habían recibido 1,0 y 1,5 mg de GnRH-hecate, respectivamente. La degeneración axonal en el grupo de 1,5 mg de GnRH-hecate estuvo acompañada por más de un 90% de reducción en la tinción de la eminencia media para GnRH.

Ejemplos 43-45

Se inyectó de forma intravenosa solución salina que contenía GnRH-hecate a siete conejos New Zealand hembra sexualmente maduros como sigue:

Tratamiento 43: 0 mg de GnRH-hecate (n=3)

Tratamiento 44: 5 mg de GnRH-hecate (n=3)

Tratamiento 45: 10 mg de GnRH-hecate (n=1).

Cuarenta y seis días más tarde se inyectó a todos los conejos de forma intramuscular 100 μg de GnRH. Se recogieron muestras de sangre a las 0, 1, 4 y 24 horas, y se midieron las concentraciones de LH y FSH en las muestras de sangre mediante radioinmunoensayo. Los análisis hormonales revelaron que tanto los animales de control como los experimentales liberaron LH en respuesta a la GnRH, lo que sugiere que puede haber al menos cierto grado de reversibilidad tras el tratamiento, al menos para las células gonadotropas de la hipófisis a dosis inferiores de ligando/péptido. Los conejos se sacrificaron al siguiente día (día 47) para los análisis histológicos postmortem. Se descubrió que el número de folículos terciarios, cuerpos lúteos y ovulaciones inducidas por GnRH se redujeron mediante el tratamiento con GnRH-hecate. Los pesos ováricos e hipofisarios se redujeron mediante el tratamiento con 10 mg de GnRH-hecate. En los tejidos de los tratamientos con GnRH-hecate, la GnRH inmunorreactiva observada fue tenue y localizada de forma difusa en las áreas del SNC que contienen normalmente cuerpos celulares; los cuerpos celulares individuales normales se redujeron en número en al menos el 50%; y las áreas terminales, que normalmente contienen los axones de las neuronas con receptores de GnRH, no se tiñeron para GnRH. Estas observaciones sugieren que los efectos más pronunciados de los tratamientos con GnRH-hecate en estos experimentos en conejos pueden haber sido sobre las neuronas neuroendocrinas del cerebro. El hipocampo y otras áreas del cerebro que contienen concentraciones elevadas de GnRH no se vieron afectadas sensiblemente por los tratamientos con GnRH-hecate. El tratamiento con GnRH-hecate incrementó el número de células hipofisarias teñidas con PAS en la parte distal hasta en un 177% respecto de los conejos de control; este incremento pareció reflejar un número incrementado de células que se teñían para α-MSH, y un número reducido de células que se teñían para LH.

Ejemplos 46-47

Se inyectó de forma intravenosa a nueve conejos hembra sexualmente maduros solución salina que contenía 0 mg (n = 4) (Tratamiento 46) o 10 mg de GnRH-hecate (n = 5) (Tratamiento 47). Se inyectó GnRH de forma intramuscular a los conejos en el día 6 postratamiento. Se recogieron muestras de sangre para el radioinmunoensayo de LH y FSH como se describió anteriormente, y los animales se sacrificaron en el día 7 postratamiento. Tanto los animales de control como los experimentales liberaron LH en respuesta a la GnRH; sin embargo, la cantidad de LH liberada fue inferior en los animales tratados que en los controles. El tratamiento con GnRH-hecate redujo el número de folículos ováricos terciarios, y el número de ovulaciones inducidas por GnRH. No se notaron efectos ni sobre los tejidos periféricos ni sobre el peso de la hipófisis. Los efectos de GnRH-hecate sobre la morfología del SNC y los resultados inmunocitoquímicos fueron similares a los descritos anteriormente en los Ejemplos 34-45. De nuevo, los efectos fueron más pronunciados sobre las neuronas de GnRH que sobre la tinción de las células gonadotropas hipofisarias.

El número de sitios de ovulación en los conejos de los Ejemplos 46 y 47 tratados con 10 mg de GnRH-hecate se redujeron comparado con los controles de solución salina. El número medio de sitios de ovulación en los cuatro controles de solución salina fue igual a 12,2 ± 5,4, con un E.S.M. = 2,7. El número medio de sitios de ovulación en los cinco conejos a los que se administraron 10 mg de GnRH-hecate fue 3,6 ± 1,1, con un E.S.M. = 0,5. Esta diferencia del control fue significativa (p = 0,025).

El "pico de LH" (la concentración de LH una hora tras la exposición a GnRH, menos la concentración de reposo antes de la exposición) en los cuatro controles fue 61,2 ± 16,5 ng/mL, con un E.S.M. = 8,3; y en el grupo tratado fue 49,6 ± 26,1 ng/mL, con un E.S.M. = 12 (p = 0,22). Así, hubo una tendencia hacia concentraciones de LH menores en el grupo tratado.

Los estudios *in vivo* demostraron claramente que el conjugado GnRH-hecate dañó de forma selectiva las células que albergaban receptores de GnRH en el cerebro (neuronas) y en la hipófisis (células gonadotropas). Además, estos estudios demostraron una alteración significativa en el ovario, presumiblemente como consecuencia de la alteración en los centros reproductores del eje cerebro-hipófisis. Se demostró la selectividad del conjugado mediante las siguientes observaciones: (1) No se observaron cambios citotóxicos en las neuronas que carecían de receptores de GnRH. (2) No se observaron cambios en las células hipofisarias que carecían de receptores de GnRH. (3) No se observaron cambios en otros tejidos endocrinos y no endocrinos (excepto el ovario, que respondió presumiblemente de manera indirecta a la destrucción de las células gonadotropas de la hipófisis).

Muchos de los sucesos denominados "ovulaciones" en los conejos tratados con GnRH-hecate fueron posiblemente sitios de ovulación que no eran funcionales, pero que pueden haber representado en su lugar cambios degenerativos preovulatorios hemorrágicos. Se llevarán a cabo ensayos reproductivos adicionales para verificar que se evita la ovulación de óvulos funcionales.

Ejemplos 48-51

Los siguientes ejemplos demostraron la capacidad de una combinación GnRH-péptido lítico para reducir la fertilidad en insectos. Se descubrió también de manera inesperada que el péptido lítico solo (es decir, administrado sin GnRH) tuvo efectos similares. Aunque no se cree que los insectos secreten una GnRH idéntica a la que se halla en mamíferos, parece haber cierta homología, ya que los insectos respondieron a la GnRH de mamíferos, y a GnRH unida al péptido lítico hecate.

Se inoculó a pupas de *Diatraea saccharalis* (perforador de caña de azúcar) de fase tardía 1,0 μL de solución salina que contenía una concentración 1,35 mM del péptido como se expuso, o solución salina sola como control. Se dejó que las pupas completasen la metamorfosis. No se observaron defectos morfológicos macroscópicos en ninguno de los insectos que completó la metamorfosis. Las polillas hembra adultas se dejaron copular con machos tratados, y después pusieron huevos. Se midió la viabilidad de los huevos contando el número de eclosiones a larvas.

El *tratamiento 48* fue el control, una inoculación de 21 pupas con solución salina sola. Doce de las pupas completaron la metamorfosis a polillas adultas (4 machos, 8 hembras). Las 8 hembras pusieron un total de alrededor de 900 huevos, una media de alrededor de 112 huevos por hembra. Alrededor del 22% de estos huevos eclosionaron, o eclosionaron alrededor de 25 larvas por hembra.

El *tratamiento 49* fue la inoculación a 10 pupas de GnRH 1,35 mM. Cuatro de las pupas completaron la metamorfosis hacia polillas adultas (2 machos, 2 hembras). Las 2 hembras pusieron un total de alrededor de 300 huevos, o una media de alrededor de 150 huevos por hembra. Alrededor del 40% de estos huevos eclosionaron, o eclosionaron alrededor de 60 larvas por hembra.

El *tratamiento 50* fue la inoculación a 10 pupas de GnRH-hecate (ID SEC Nº 3) 1,35 mM. Ocho de las pupas completaron la metamorfosis hacia polillas adultas (3 machos, 5 hembras). Las 5 hembras pusieron un total de 200 huevos, o una media de alrededor de 40 huevos por hembra. Alrededor del 40% de estos huevos eclosionaron, o eclosionaron alrededor de 16 larvas por hembra.

El *tratamiento 51* fue la inoculación a 10 pupas de D-hecate. Seis de las pupas completaron la metamorfosis a polillas adultas (2 machos, 4 hembras). Las 4 hembras pusieron un total de 18 huevos, o una media de 4,5 huevos por hembra. El 100% de estos huevos eclosionó, o eclosionaron alrededor de 4,5 larvas por hembra.

Se observó así que, comparado con los controles, las hembras tratadas con GnRH sola en la fase de pupa tardía tuvieron un éxito reproductor incrementado; aquellas tratadas con la combinación GnRH-hecate tuvieron un éxito reproductor disminuido; y aquellas tratadas con D-hecate solo tuvieron un éxito reproductor aún menor.

Sin desear limitarse por la siguiente hipótesis, se cree que estos resultados se pueden explicar como sigue. Debido a la homología de secuencia (por ahora sin identificar) entre taxones, los péptidos pequeños activos en el control de la reproducción en mamíferos también influyen en la función reproductora de los insectos. Véase W. Theunis *et al*., "Luteinising Hormone, Follicle Stimulating Hormone and Gonadotropin Releasing Hormone Immunoreactivity in Two Insects: Locusta migratoria migratoroides R & F and Sarcophaga bullata (Parker)", Invert. Reprod. and Develop., vol. 16, págs. 111-117 (1989); y P. Verhaert *et al*., "Substances Resembling Peptides of the Vertebrate Gonadotropin System Occur in the Central Nervous System of Periplaneta americana L.", Insect Biochem., vol. 16, págs. 191-197 (1986).

Esta actividad está mediada probablemente por la capacidad inherente de estos péptidos de reaccionar con las células intermedias apropiadas mediante una interacción ligando-receptor, por lo que se altera la actividad funcional de las células intermedias. Más particularmente, los insectos tienen un receptor que responde a la GnRH de mamíferos. La GnRH sola estimula la actividad reproductora en insectos. La GnRH acoplada a un péptido lítico ataca a las células intermedias en los insectos, por lo que se inhibe la actividad reproductora.

Los resultados observados para el D-hecate administrado sin GnRH fueron sorprendentes, y se explican de manera ligeramente diferente, de nuevo sin desear limitarse por la siguiente hipótesis. La metamorfosis es un momento de elevada actividad celular. Los péptidos líticos generalmente tienen una actividad mayor contra las células activas. Se cree que la respuesta observada a hecate solo es una respuesta generalizada por las células activadas, y no una respuesta específica mediada por un receptor. Puede ser significativo el hecho de haber usado la conformación D de hecate en este experimento, ya que los péptidos en forma D tienen en general una semivida biológica más larga. Actualmente no se sabe si se observarían resultados similares con L-hecate solo (se usó D-hecate en el Tratamiento 26 por la simple razón de que el D-hecate previamente sintetizado estaba disponible de inmediato para los investigadores).

Tratamiento de tumores malignos y benignos

Las composiciones de la presente invención son útiles para destruir o inhibir el crecimiento de células tumorales malignas y benignas que expresan receptores para GnRH, LH, hCG, 1-LHRH-III o esteroides. El ligando se administra con un péptido lítico (de forma secuencial, o unidos entre sí) y las células tumorales seleccionadas como objetivo se destruyen o se inhiben.

En el tratamiento de cánceres asociados a hormonas o ligandos (p. ej., cánceres del ovario, testículo, mama, útero, endometrio, hipófisis y próstata), los péptidos líticos se pueden unir a la hormona para la cual el tumor expresa un receptor o grupo de receptores, p. ej., un estrógeno, testosterona, LH, FSH, estradiol-17β, factor de crecimiento transformante α (TGFα), factor de crecimiento epidérmico (EGF), GnRH, LH, hCG, LHRH-III de lamprea (1-LHRH-III) y hormona estimulante de melanocitos. Por ejemplo, se puede hacer convenientemente un enlace éster de un péptido lítico a estradiol o testosterona condensando el extremo carboxilo del péptido lítico con el grupo hidroxilo en la posición del carbono 17 del esteroide. Se puede usar una combinación estradiol/péptido lítico como tratamiento contra el cáncer de mama u ovárico; y se puede usar una combinación testosterona/péptido lítico para tratar el cáncer de próstata. Además, se pueden usar los dominios de unión específicos para la hormona peptídica LH o FSH en péptidos de fusión con un péptido lítico para unir de manera selectiva el péptido de fusión a las células tumorales seleccionadas como objetivo con receptores en la superficie celular para estas hormonas. Por ejemplo, se puede usar el sitio de unión al receptor de la subunidad β de LH y hCG (ID SEC Nº 11). Véase Morbeck *et al*., Mol. and Cell Endocrin., vol. 97, págs. 173-186 (1993).

Tumores hipofisarios

La hipófisis anterior contiene diferentes tipos de células epiteliales que controlan los complejos procesos del crecimiento, la reproducción, la lactancia, la función tiroidea y las funciones adrenales. Debido a la elevada plasticidad funcional de las células hipofisarias (es decir, su capacidad para diferenciarse en diferentes fenotipos celulares en respuesta a estímulos), estas células son particularmente propensas a un comportamiento anormal. Debido a que muchas de las señales a las que responde la hipófisis están mediadas por receptores, los estados patológicos se pueden controlar interviniendo en la interacción ligando-receptor apropiada. Se proporcionan varios ejemplos a continuación.

Receptores de dopamina en prolactinomas y otros adenomas

La deficiencia crónica de dopamina se ha asociado con ciertos tipos de tumores hipofisarios. En ciertos adenomas, el número de sitios de unión de dopamina está reducido en alrededor del 50%, y el número se puede reducir incluso más durante la terapia dopaminérgica. También se ha informado que el factor de crecimiento nervioso puede estimular a las células de prolactinoma para que reexpresen los receptores de dopamina. El tratamiento previo de un prolactinoma con factor de crecimiento nervioso antes del tratamiento con una combinación de dopamina-péptido lítico lo hace susceptible al tratamiento por medio de la presente invención. El péptido lítico se puede unir a dopamina, por ejemplo, mediante un grupo amida formado condensando el extremo carboxilo del péptido con el grupo amino de la dopamina.

Esta terapia será eficaz no solamente para prolactinomas, sino también para otros adenomas que expresan receptores de dopamina, tales como adenomas secretores de hormona de crecimiento, adenomas secretores de hormona liberadora de tirotropina y adenomas secretores de gonadotropina.

Receptores de somatostatina en adenomas secretores de hormona de crecimiento

Se ha informado que los adenomas secretores de hormona de crecimiento (GH) tienen un número sumamente variable de receptores de somatostatina (se puede observar una variación de al menos un factor de 10 entre tumores individuales). También existe una variación considerable en la distribución de los sitios de unión: los receptores de somatostatina pueden estar distribuidos de manera homogénea, localizados exclusivamente en una porción del tejido tumoral, o en medio.

Los receptores de somatostatina están presentes también en otros tipos de tumores hipofisarios. Se ha informado que las superficies celulares de una mayoría de adenomas secretores de GH y de hormona liberadora de tirotropina (TRH) tienen un número elevado de receptores de somatostatina.

Tales tumores se pueden tratar mediante la presente invención mediante una combinación somatostatina/péptido lítico.

Otros adenomas hipofisarios

Otros ligandos que se pueden usar en una combinación ligando/péptido lítico para tratar otros adenomas hipofisarios incluyen TRH, MSH, GnRH, hormona liberadora de corticotropina, hormona liberadora de la hormona de crecimiento, polipéptido intestinal vasoactivo y péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria. Un análogo de cadena corta de αMSH que se puede usar en lugar de MSH es Ser-Tyr-Cys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Asn-Lys-Pro-Val-NH_2 (ID SEC Nº 10).

Otras enfermedades endocrinas

En otras aplicaciones, la combinación ligando/péptido lítico de la presente invención se puede usar para tratar enfermedades endocrinas en general. Cuando una enfermedad está relacionada causalmente con una disfunción de células que tienen ciertos receptores hormonales, las células con tales receptores se pueden inactivar de manera selectiva administrando una combinación de la hormona y un péptido lítico.

En una aproximación alternativa, se ha observado previamente que es beneficioso reducir los niveles de LH y FSH en los pacientes de cáncer de mama y de próstata. Si las células gonadotropas de la hipófisis se destruyen selectivamente con una combinación GnRH/péptido lítico, entonces la hipófisis no secretará ya LH y FSH. Los niveles reducidos de estas hormonas que se obtienen como resultado ayudarán así a controlar la propagación de los cánceres. Esta aproximación alternativa indirecta se puede usar en lugar o además del tratamiento de los cánceres directamente con una combinación LH/péptido lítico o FSH/péptido lítico. La administración crónica de GnRH se ha usado previamente para disminuir la actividad de sus receptores, y así eliminar de manera eficaz la LH de la circulación, lo que da como resultado la "castración química" de los pacientes de cáncer prostático. Sin embargo, GnRH y ciertos análogos de GnRH tienen también efectos directos sobre el crecimiento de las células prostáticas.

Por analogía, está establecido que la extirpación quirúrgica de la hipófisis anterior es eficaz para tratar las enfermedades relacionadas con las hormonas sexuales. La destrucción química de las células gonadotropas de la hipófisis por medio de la presente invención tendrá por lo tanto efectos similares sobre las enfermedades relacionadas con las hormonas sexuales, pero sin los riesgos y las complicaciones concomitantes de la cirugía.

Ejemplos 52-58

En estos experimentos se demostró la lisis *in vitro* de líneas celulares de cáncer de próstata humano. Se adquirieron las líneas celulares de cáncer de próstata humano LNCaP FGC y DU145 de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville MD), números de acceso de ATCC CRL 1740 y HTB-81, respectivamente. La línea celular de adenocarcinoma LNCaP FGC se obtuvo originariamente de un paciente varón de raza blanca de 50 años de edad. Las células LNCaP FGC son sensibles a dihidrotestosterona y a los estrógenos (A+). El carcinoma DU145 se aisló originariamente del cerebro de un varón de raza blanca de 69 años de edad con un carcinoma metastásico de próstata; esta línea celular no es sensible a hormonas esteroideas (A-).

Las células se separaron de los matraces de cultivo, y se transfirieron 1000 células/pocillo a placas de cultivo de 24 pocillos. Las células se incubaron durante 24 horas con un 10% de suero bovino. Las células se incubaron posteriormente sin suero durante 48 horas. Las células se incubaron después durante 22 horas con uno de los siguientes tratamientos:

Tratamiento 52: hormona luteinizante (LH) 10 μM

Tratamiento 53: hecate libre 30 μM

Tratamiento 54: hecate-bLH 90 μM

Tratamiento 55: hecate-bLH 60 μM

Tratamiento 56: GnRH-hecate 50 μM

Tratamiento 57: GnRH-hecate 10 μM

Tratamiento 58: pretratamiento con FSH, seguido de hecate-bLH 90 μM

Se usó la exclusión de azul Trypan para determinar la viabilidad de las células tras el tratamiento. El tratamiento que destruyó de manera más consistente y eficaz las líneas de células cancerosas A+ y A- fue la dosis más elevada de GnRH-hecate (50 μM). La dosis menor de GnRH-hecate (10 μM) fue igualmente eficaz contra las células DU145 insensibles a andrógenos. Las células DU145 se destruyeron también mediante hecate solo. Sin embargo, el tratamiento con un péptido lítico solo puede no ser selectivo *in vivo* a menos que se estimulen por separado los tipos celulares específicos, por ejemplo mediante hormonas que controlan su actividad. El conjugado hecate-bLH destruyó casi todas las células DU145, pero tuvo poco efecto sobre LNCaP A+. Este resultado es coherente con la unión específica de LH a las células DU145 pero no a las células LNCaP. LH se une específicamente a las células DU145, pero no se ha podido medir de manera consistente la unión específica de LH a las células LNCaP A+. Las células LNCaP pretratadas con FSH fueron más sensibles al conjugado hecate-bLH que aquellas que no se pretrataron.

Otras aplicaciones, que incluyen el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y la selección como objetivo de células anormales

Esta invención se puede usar dondequiera que sea deseable inhibir de manera específica células anormales (o normales) que están controladas por, o dependen de, interacciones con ligandos específicos. Como otro ejemplo, esta invención se puede usar para tratar enfermedades autoinmunitarias para las que se conoce el antígeno o epítopo responsable de la enfermedad autoinmunitaria.

Las respuestas inmunitarias específicas están mediadas por los linfocitos B, los linfocitos T o ambos. Cuando los linfocitos atacan erróneamente "lo propio" en vez de "lo ajeno", se puede dar como resultado una diversidad de enfermedades autoinmunitarias, algunas de las cuales pueden tener consecuencias devastadoras. Las enfermedades que se han asociado con la autoinmunidad incluyen la artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, lupus eritematoso

sistémico, enfermedad de Addison, síndrome de Goodpasture, anemia hemolítica autoinmune, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, diabetes mellitus dependiente de insulina, miastenia gravis, infarto de miocardio, anemia aplásica, anemia perniciosa, glomerulonefritis postestreptocócica, infertilidad espontánea, espondilitis anquilosante, esclerodermia y síndrome de Sjögren.

Ya esté mediada por células T o por células B, la enfermedad autoinmunitaria se caracteriza por linfocitos con receptores específicos para un epítopo propio que desencadena su función, es decir, la secreción de anticuerpos, la proliferación, la secreción de factores citotóxicos, o la secreción de citocinas inflamatorias. Estas respuestas provocan el daño o la destrucción de células u órganos propios.

Se han identificado para varias enfermedades autoinmunitarias los antígenos específicos e incluso los epítopos que actúan como ligandos para estimular a los linfocitos, típicamente mediante la respuesta proliferativa *in vitro* que inducen en los linfocitos. Por ejemplo, se ha implicado a la tirotropina como el autoantígeno reconocido por los linfocitos en la enfermedad de Hashimoto. Cuando se conoce el epítopo, la enfermedad autoinmunitaria se puede tratar administrando un compuesto que contiene ese epítopo unido a un péptido lítico, que eliminará de manera selectiva los clones de los linfocitos autorreactivos.

No ha habido previamente tratamientos generales para las enfermedades autoinmunitarias. Los tratamientos previos han incluido compuestos citotóxicos y dosis elevadas de corticoesteroides, los cuales tienen riesgos en la terapia a largo plazo. Ninguno de ellos se dirige de manera selectiva a los linfocitos autorreactivos.

Ciertas células anormales (p. ej., células infectadas por virus, tales como las células infectadas por VIH, células cancerosas) exhiben receptores de superficie que no se hallan en las células normales. En algunos casos, estos receptores están codificados en los ácidos nucleicos víricos. Los ligandos para estos receptores, tales como los anticuerpos monoclonales para estos receptores, o los pares receptor/ligando mostrados en la Tabla 2 de D. Fitzgerald *et al*., "Targeted Toxin Therapy for the Treatment of Cancer", J. Natl. Cancer Inst., vol. 81, págs. 1455-1463, se pueden usar en la combinación ligando/péptido lítico de la presente invención para destruir de manera selectiva las células que exhiben el receptor. La destrucción de una célula infectada por virus, por ejemplo, antes de la finalización del ciclo de maduración vírico da como resultado la liberación de partículas virales incompletas no infecciosas, por lo que se trata la infección viral. La destrucción de una célula cancerosa evita la metástasis posterior. Cuando se usa un anticuerpo como ligando, será preferible a menudo administrar el anticuerpo y el péptido lítico de manera secuencial, en vez de unirlos entre sí. El complemento y otras respuestas a los anticuerpos unidos hacen a las células más susceptibles al ataque por los péptidos líticos.

Péptidos líticos útiles en la presente invención

Se cree (sin desear limitarse por esta teoría) que los péptidos líticos actúan alterando las membranas celulares. Las células eucarióticas "en reposo" se protegen a sí mismas por medio de su capacidad de reparar los daños de la membrana. Por contraste, las células activadas (p. ej., las células estimuladas mediante GnRH) son incapaces (o menos capaces) de reparar las membranas dañadas. Debido a que las células hipofisarias activadas con GnRH tienen una capacidad disminuida de reparar las membranas, son destruidas de forma preferente por los péptidos líticos, mientras las células adyacentes sin activar reparan sus membranas y sobreviven.

Aunque las realizaciones de esta invención que se han ensayado hasta la fecha han usado hecate como péptido lítico efector, esta invención funcionará también con una combinación de un ligando con otros péptidos líticos. Se conocen muchos péptidos líticos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquellos mencionados en las referencias citadas en la siguiente discusión.

Los péptidos líticos son péptidos pequeños y básicos. Los péptidos líticos nativos parecen ser componentes principales de los sistemas de defensa antimicrobianos de varias especies animales, que incluyen insectos, anfibios y mamíferos. Comprenden típicamente 23-39 aminoácidos, aunque pueden ser más pequeños. Tienen la capacidad de formar hélices α anfipáticas. Véase Boman *et al*., "Humoral immunity in Cecropia pupae", Curr. Top. Microbiol. Immunol. vol. 94/95, págs. 75-91 (1981); Boman *et al*., "Cell-free immunity in insects", Annu. Rev. Microbiol., vol. 41, págs. 103-126 (1987); Zasloff, "Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial DNA sequence of a precursor", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, págs. 3628-3632 (1987); Ganz *et al*., "Defensins natural peptide antibiotics of human neutrophils", J. Clin. Invest., vol. 76, págs. 1427-1435 (1985); y Lee *et al*., "Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, págs. 9159-9162 (1989).

Las secuencias de aminoácidos conocidas para los péptidos líticos se pueden modificar para crear nuevos péptidos que se esperaría que también tengan actividad lítica mediante sustituciones de residuos de aminoácidos que conservan la naturaleza anfipática de los péptidos (p. ej., sustituyendo un residuo polar con otro residuo polar, o un residuo apolar con otro residuo apolar, etc.); mediante sustituciones que conservan la distribución de cargas (p. ej., sustituyendo un residuo ácido con otro residuo ácido, o un residuo básico con otro residuo básico, etc.); o alargando o acortando la secuencia de aminoácidos a la vez que se conserva su carácter anfipático o su distribución de cargas. Los péptidos líticos y sus secuencias se describen en Yamada *et al*., "Production of recombinant sarcotoxin IA in Bombyx mori cells", Biochem. J., vol. 272, págs. 633-666 (1990); Taniai et al., "Isolation and nucleotide sequence of cecropin B cDNA clones from the silkworm, Bombyx mori", Biochimica Et Biophysica Acta, vol. 1132, págs. 203-206 (1992);

Boman *et al*., "Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids", Febs Letters, vol. 259, págs. 103-106 (1989); Tessier et al., "Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide", Gene, vol. 98, págs. 177-183 (1991); Blondelle *et al*., "Hemolytic and antimicrobial activities of the twenty-four individual omission analogs of melittin", Biochemistry, vol. 30, págs. 4671-4678 (1991); Andreu *et al*., "Shortened cecropin A-melittin hybrids. Significant size reduction retains potent antibiotic activity", Febs Letters, vol. 296, págs. 190-194 (1992); Macias *et al*., "Bactericidal activity of magainin 2: use of lipopolysaccharide mutants", Can. J. Microbiol., vol. 36, págs. 582-584 (1990); Rana *et al*., "Interactions between magainin-2 and Salmonella typhimurium outer membranes: effect of Lipopolysaccharide structure", Biochemistry, vol. 30, págs. 5858-5866 (1991); Diamond *et al*., "Airway epithelial cells are the site of expression of a mammalian antimicrobial peptide gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, págs. 4596 y sgtes. (1993); Selsted *et al*., "Purification, primary structures and antibacterial activities of β-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils", J. Biol. Chem., vol. 268, págs. 6641 y sgtes. (1993); Tang *et al*., "Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial β-defensin peptide from bovine neutrophils", J. Biol. Chem., vol. 268, págs. 6649 y sgtes. (1993); Lehrer *et al*., Blood, vol. 76, págs. 2169-2181 (1990); Ganz *et al*., Sem. Resp. Infect. I., págs. 107-117 (1986); Kagan *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, págs. 210-214 (1990); Wade *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 87, págs. 4761-4765 (1990); Romeo *et al*., J. Biol. Chem., vol. 263, págs. 9573-9575 (1988); Jaynes *et al*., "Therapeutic Antimicrobial Polypeptides, Their Use and Methods for Preparation", documento WO 89/00199 (1989); Jaynes, "Lytic Peptides, Use for Growth, Infection and Cancer", documento WO 90/12866 (1990); Berkowitz, "Prophylaxis and Treatment of Adverse Oral Conditions with Biologically Active Peptides", documento WO 93/01723 (1993).

Las familias de péptidos líticos naturales incluyen las cecropinas, las defensinas, las sarcotoxinas, las melitinas y las magaininas. Boman y colaboradores en Suecia realizaron el trabajo original sobre el sistema de defensa humoral de *Hyalophora cecropia*, la polilla de la seda gigante, que la protege de la infección bacteriana. Véase Hultmark *et al*., "Insect immunity. Purification of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of Hyalophora cecropia", Eur. J. Biochem., vol. 106, págs. 7-16 (1980); y Hultmark *et al*., "Insect immunity. Isolation and structure of cecropin D. and four minor antibacterial components from cecropia pupae", Eur. J. Biochem., vol. 127, págs. 207-217 (1982).

La infección en *H. cecropia* induce la síntesis de proteínas especializadas capaces de alterar las membranas celulares bacterianas, lo que da como resultado la lisis y la muerte celular. Entre estas proteínas especializadas están las conocidas colectivamente como cecropinas. Las cecropinas principales, cecropina A, cecropina B y cecropina D, son péptidos básicos pequeños y sumamente homólogos. En colaboración con Merrifield, el grupo de Boman demostró que la mitad aminoterminal de las diversas cecropinas contiene una secuencia que formará una hélice α anfipática. Andreu *et al*., "N-terminal analogues of cecropin A: synthesis, antibacterial activity, and conformational properties", Biochem., vol. 24, págs. 1683-1688 (1985). La mitad carboxiterminal del péptido comprende una cola hidrófoba. Véase también Boman *et al*., "Cell-free immunity in Cecropia", Eur. J. Biochem., vol. 201, págs. 23-31 (1991).

Se ha aislado un péptido similar a cecropina de intestino porcino. Lee *et al*., "Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, págs. 9159-9162 (1989).

Se ha observado que los péptidos de cecropina destruyen varios patógenos de animales distintos de las bacterias. Véase Jaynes *et al*., "*In Vitro* Cytocidal Effect of Novel Lytic Peptides on Plasmodium falciparum and Trypanosoma cruzi", FASEB, 2878-2883 (1988); Arrowood *et al*., "Hemolytic properties of lytic peptides active against the sporozoites of Cryptosporidium parvum", J. Protozool., vol. 38, Nº 6, págs. 161S-163S (1991); y Arrowood *et al*., "*In vitro* activities of lytic peptides against the sporozoites of Cryptosporidium parvum", Antimicrob. Agents Chemother., vol. 35, págs. 224-227 (1991). Sin embargo, las células mamíferas normales no parecen verse afectadas de manera adversa por las cecropinas, incluso a concentraciones elevadas. Véase Jaynes *et al*., "*In vitro* effect of lytic peptides on normal and transformed mammalian cell lines", Peptide Research, vol. 2, Nº 2, págs. 1-5 (1989); y Reed *et al*., "Enhanced *in vitro* growth of murine fibroblast cells and preimplantation embryos cultured in medium supplemented with an amphipathic peptide", Mol. Reprod. Devel., vol. 31, Nº 2, págs. 106-113 (1992).

Las defensinas, halladas originariamente en los mamíferos, son péptidos pequeños que contienen de seis a ocho residuos de cisteína. Ganz *et al*., "Defensins natural peptide antibiotics of human neutrophils", J. Clin. Invest., vol. 76, págs. 1427-1435 (1985). Los extractos de neutrófilos humanos normales contienen tres péptidos de defensina: los péptidos de neutrófilos humanos HNP-1, HNP-2 y HNP-3. Los péptidos de defensinas se han descrito también en insectos y en plantas superiores. Dimarcq *et al*., "Insect immunity: expression of the two major inducible antibacterial peptides, defensin and diptericin, in Phormia terranvae", EMBO J., vol. 9, págs. 2507-2515 (1990); Fisher *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, págs. 3628-3632 (1987).

Se han purificado péptidos ligeramente mayores llamados sarcotoxinas de la mosca de la carne *Sarcophaga peregrina*. Okada *et al*., "Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of Sarcophaga peregrina (flesh fly) larvae", J. Biol. Chem., vol. 260, págs. 7174-7177 (1985). Aunque son sumamente divergentes de las cecropinas y las defensinas, las sarcotoxinas tienen presumiblemente una función antibiótica similar.

Otros péptidos líticos se han hallado en anfibios. Gibson y colaboradores aislaron dos péptidos de la rana africana, *Xenopus laevis*, péptidos que nombraron PGS y $Gly^{10}Lys^{22}$PGS. Gibson *et al*., "Novel peptide fragments originating from PGL and the caervlein and xenopsin precursors from Xenopus laevis", J. Biol. Chem., vol. 261, págs. 5341-5349 (1986); y Givannini *et al*., "Biosynthesis and degradation of peptides derived from Xenopus laevis prohormones",

Biochem. J., vol. 243, págs. 113-120 (1987). Zasloff demostró que los péptidos derivados de Xenopus tienen actividad antimicrobiana, y los renombró magaininas. Zasloff, "Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial DNA sequence of a precursor", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, págs. 3628-3632 (1987).

Se ha informado de la síntesis de análogos no homólogos de diferentes clases de péptidos líticos para revelar que una secuencia anfipática cargada positivamente que contiene al menos 20 aminoácidos pareció ser un requerimiento para la actividad lítica de algunas clases de péptidos. Shiba *et al*., "Structure-activity relationship of Lepidopteran, a self-defense peptide of Bombyx more", Tetrahedron, vol. 44, Nº 3, págs. 787-803 (1988). Otro trabajo ha demostrado que también pueden ser líticos los péptidos más pequeños. Véase McLaughlin *et al*., citado más adelante.

Se ha demostrado que las cecropinas se dirigen a patógenos o células comprometidas de manera selectiva, sin afectar a las células hospedadoras normales. Se ha demostrado que el péptido lítico sintético conocido como S-1 (o Shiva 1) destruye células hospedadoras infectadas con *Brucella abortus*, *Trypanosoma cruzi*, *Cryptosporidium parvum*, y herpesvirus bovino infeccioso I (IBR), con poco o ningún efecto tóxico sobre las células mamíferas sin infectar. Véase Jaynes *et al*., "*In vitro* effect of lytic peptides on normal and transformed mammalian cell lines", Peptide Research, vol. 2, Nº 2, págs. 1-5 (1989); Wood *et al*., "Toxicity of a Novel Antimicrobial Agent to Cattle and Hamster cells *In vitro*", Proc. Ann. Amer. Soc. Anim. Sci., Utah State University, Logan, UT. J. Anim. Sci. (Supl. 1), vol. 65, pág. 380 (1987); Arrowood *et al*., "Hemolytic properties of lytic peptides active against the sporozoites of Cryptosporidium parvum", J. Protozool., vol. 38, Nº 6, págs. 161S-163S (1991); Arrowood *et al*., "*In vitro* activities of lytic peptides against the sporozoites of Cryptosporidium parvum", Antimicrob. Agents Chemother., vol. 35, págs. 224-227 (1991); y Reed *et al*., "Enhanced *in vitro* growth of murine fibroblast cells and preimplantation embryos cultured in medium supplemented with an amphipathic peptide", Mol. Reprod. Devel., vol. 31, Nº 2, págs. 106-113 (1992).

Morvan *et al*., "*In vitro* activity of the antimicrobial peptide magainin 1 against Bonamia ostreae, the intrahemocytic parasite of the flat oyster Ostrea edulis", Mol. Mar. Biol., vol. 3, págs. 327-333 (1994) informa del uso *in vitro* de una magainina para reducir de manera selectiva la viabilidad del parásito *Bonamia ostreae* a dosis que no afectaron a las células de la ostra plana *Ostrea edulis*.

Son de interés también los péptidos sintéticos descritos en las siguientes solicitudes de patente en tramitación, péptidos que tienen actividad lítica con solamente 10-14 residuos de aminoácidos: McLaughlin et al., "Amphipathic Peptides", solicitud de patente de Estados Unidos de número de serie 08/681.075, presentada el 22 de julio de 1996; y Mark L. McLaughlin et al., "Short Amphipathic Peptides with Activity against Bacteria and Intracellular Pathogens", solicitud de patente de Estados Unidos de número de serie 08/796.123, presentada el 6 de febrero de 1997.

Los péptidos líticos tales como los que se conocen en general en la técnica se pueden usar para poner en práctica la presente invención. Es deseable una toxicidad selectiva hacia las células activadas por el ligando, especialmente cuando el ligando y el péptido se administran por separado. La toxicidad selectiva es menos importante cuando el ligando y el péptido están unidos entre sí, porque en ese caso el péptido se concentra de manera eficaz cerca de las células que tienen receptores para el ligando.

Los ejemplos de tales péptidos son los designados D1A21 (ID SEC Nº 5), D2A21 (ID SEC Nº 6), D5C (ID SEC Nº 7) y D5C1 (ID SEC Nº 8). Estos péptidos y otros péptidos líticos adecuados para el uso en la presente invención se describen en Jaynes, "Methods for the Design of Amphipathic Peptides Having Enhanced Biological Activities", solicitud de patente provisional de Estados Unidos de número de serie 60/027.628, presentada el 4 de octubre de 1996. En los ensayos hasta la fecha que usan estos péptidos solos (es decir, uno de estos cuatro péptidos sin un ligando asociado), los valores de DL_{50} *in vitro* contra las líneas celulares de cáncer de próstata humano han oscilado de alrededor de 0,57 μM a alrededor de 1,61 μM. En los ensayos hasta la fecha que usan D2A21 solo (es decir, sin un ligando asociado) los valores de DL_{50} contra las líneas celulares de cáncer de mama, vejiga, colon, cuello uterino, pulmón y piel humano han oscilado de alrededor de 0,28 μM a alrededor de 3,1 μM. Como comparación, se ha medido la DL_{50} y es mayor de 100 μM para D2A21, D5C y D5C1 para cada uno de los siguientes tipos de células humanas normales no cancerosas: células endoteliales, fibroblastos, células entéricas y queratinocitos. Para D2A21, DL_{50} se ha medido y es alrededor de 100 μM para monocitos de sangre periférica humana, y es mayor de 100 μM para células T de sangre periférica humana.

Se pueden conjugar otros análogos de GnRH con un péptido lítico de acuerdo con esta invención. Entre los análogos que se pueden usar como parte de tal conjugado está 1-LHRH-III (o 1-GnRH-III), ID SEC Nº 16. Se ha informado que este péptido inhibe el crecimiento de varias células cancerosas. Véase I. Mezô *et al*., "Synthesis of Gonadotropin-Releasing Hormone III Analogs. Structure-Antitumor Activity Relationships", J. Med. Chem. vol. 40, págs. 3353-3358 (1997). El mismo 1-LHRH-III provoca de manera selectiva la liberación de FSH. Véase W. Yu *et al*., "A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat", Proc. Natl. Acad. Sci USA, vol. 94, págs. 9499-9503 (1997); y la solicitud de patente de Estados Unidos de n.s. 08/869.153, presentada el 4 de junio de 1997. Los conjugados de péptido lítico de 1-LHRH-III serán útiles como anticonceptivos, y en el tratamiento de cánceres tales como cáncer de próstata. Se pueden usar también los agonistas de 1-LHRH-III, tales como los descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos de n.s. 08/869.153.

Miscelánea

Como se usa en las reivindicaciones, una "cantidad eficaz" de una composición es una cantidad suficiente para destruir de manera selectiva las células seleccionadas como objetivo en una población de fondo de células no seleccionadas como objetivo. Cuando sea apropiado en el contexto, una "cantidad eficaz" de una composición es también una cantidad que es suficiente para inducir la anticoncepción o esterilidad a largo plazo en un mamífero. Cuando sea apropiado en el contexto, una "cantidad eficaz" de GnRH o 1-LHRH-III es una cantidad suficiente para restaurar temporalmente la fertilidad en un animal que se ha hecho estéril mediante la destrucción de las células gonadotropas. Como se usa en las reivindicaciones, el término "animal" pretende incluir tanto metazoos humanos como no humanos.

REIVINDICACIONES

1. El uso de un compuesto que comprende: (a) un dominio hormonal seleccionado del grupo que consiste en hormona liberadora de gonadotropina, la subunidad beta de la gonadotropina coriónica, bLH, hormona luteinizante, gonadotropina coriónica, y los análogos de estas hormonas; y (b) un dominio de péptido lítico, en el que el dominio hormonal y el péptido lítico están unidos químicamente entre sí para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer de mama.

2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho dominio hormonal está unido directamente a dicho dominio de péptido lítico, sin un dominio de unión intermedio que una dicho dominio hormonal a dicho dominio de péptido lítico.

3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho dominio de péptido lítico se selecciona del grupo que consiste en un péptido de cecropina, un péptido de melitina, un péptido de defensina, un péptido de magainina, un péptido de sarcotoxina, y los análogos de dichos péptidos.

4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho dominio de péptido lítico comprende hecate.

5. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto tiene la secuencia ID SEC Nº 3 ó ID SEC Nº 4.

6. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho compuesto tiene la secuencia ID SEC Nº 12 ó ID SEC Nº 15.

7. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho dominio hormonal, o dicho dominio de péptido lítico, o ambos, comprenden residuos de aminoácidos en conformación D.

8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente un dominio portador para facilitar la absorción en el intestino cuando el compuesto se administra de manera oral.

9. El uso según la reivindicación 8, en el que dicho dominio portador comprende un dominio de vitamina B_{12}.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: La. State Univ. & Mech. Coli., Board of Supervisors
Enright, Frederick M.
Jaynes, Jesse M.
Hansel, William
Koonce, Kenneth L.
McCann, Samuel M.
Yu, Wen H.
Melrose, Patricia A.
Foil, Lane D.
Elzer, Philip H.

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Composiciones de ligando/péptido lítico y métodos de uso

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 18

(iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: John H. Runnels

(B) CALLE: P. O. Box 2471

(C) CIUDAD: Baton Rouge

(D) ESTADO: LA

(E) PAÍS: USA

(F) CÓDIGO POSTAL: 70821-2471

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible

(B) ORDENADOR: Ordenador personal de IBM compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release nº 1.0, Versión Nº 1.25

(vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 27-MAR-1998

(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DE ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Runnels, John H.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.451

(C) NÚMERO DE REFERENCIA/CERTIFICADO: 96A3.2

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO: (504) 387-3221

(B) TELEFAX: (504) 346-8049

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..10

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Xaa en la posición 1 indica ácido piroglutámico. Esta secuencia es GnRH”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:1:

Xaa His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..23

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Esta secuencia es hecate”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:2:

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys
1 5 10 15
Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..33

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Esta secuencia es un péptido de fusión GnRH modificada/hecate”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:3:

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Phe Ala Leu Ala Leu Lys
1 5 10 15
Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Ala
20 25 30
Leu

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..33

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Esta secuencia es un péptido de fusión hecate/GnRH modificada"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:4:

Phe Ala Leu Ala Leu Lus Ala Leu Lus Lus Ala Leu Lys Lys Leu Lys
1 5 10 15
Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro
20 25 30
Gly

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..23

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Esta secuencia es D1A21".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:5:

Phe Ala Phe Ala Phe Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe Lys Lys Phe Lys
1 5 10 15
Lys Ala Phe Lys Lys Ala Phe
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 23 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..23

(D) OTRA INFORMACIÓN: /notas "Esta secuencia es D2A21".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:6:

Phe Ala Lys Lys Phe Ala Lys Lys Phe Lys Lys Phe Ala Lys Lys Phe
1 5 10 15
Ala Lys Phe Ala Phe Ala Phe
20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..27

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Esta secuencia es D5C”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SBQ ID NO:7:

Lys Arg Lys Arg Ala Val Lys Arg Val Gly Arg Arg Leu Lys Lys Leu
1 5 10 15
Ala Arg Lys Ile Ala Arg Leu Gly Val Ala Phe
20 25

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..37

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Esta secuencia es D5C1”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:8:

Lys Arg Lys Arg Ala Val Lys Arg Val Gly Arg Arg Leu Lys Lys Leu
1 5 10 15
Ala Arg Lys Ile Ala Arg Leu Gly Val Ala Lys Leu ala Gly Leu Arg
20 25 30
Ala Val Leu Lys Phe
35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..10

(D) OTRA INFORMACIÓN: /notas “Esta secuencia es una GnRH modificada”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:9:

Gln His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..13

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Esta secuencia es una alfa-MSH modificada”

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:10:

Ser Tyr Cys Met Glu His Phe ARg Trp Asn Lys Pro Val
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:11.

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..15

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Esta secuencia es bLH”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:11:

Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu Cys Arg Arg
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 38 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..38

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Esta secuencia es un péptido de fusión hecate-blH”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:12:

Phe Ala Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Ley Lys
1 5 10 15

Lys Ala Leu Lys Lys Ala Leu Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln
20 25 30

Cys Ala Leu Cys Arg Arg
35

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..10

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Xaa en la posición 1 indica ácido piroglutámico. Xaa en la posición 6 indica D-lisina. Esta secuencia es D-Lys-6 GnRH”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:13:

Xaa His Trp Ser Tyr Xaa Leu Arg Pro Gly
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..10

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Xaa en la posición 1 indica ácido piroglutámico. Xaa en la posición 6 indica acilo-D-lisina”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:14:

Xaa His Trp Ser Tyr Xaa Leu Arg Pro Gly
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..33

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Xaa en la posición 1 indica ácido piroglutámico. Esta secuencia es un péptido de fusión 1-LHRH-III/hecate".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:15:

Xaa His Trp Ser His Asp Trp Lys Pro Gly Phe Ala Leu Ala Leu Lys
1 5 10 15
Ala Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Leu Lys Lys Ala Leu Lys Lys Ala
20 25 30
Leu

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..10

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Xaa en la posición 1 indica ácido piroglutámico. Esta secuencia es 1-LHRH-III".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:16:

Xaa His Trp Ser His Asp Trp Lys Pro Gly
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..10

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Xaa en la posición 1 indica ácido piroglutámico. Esta secuencia es GnRH I de gallina".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:17:

Xaa His Trp Ser Tyr Gly Leu Gln Pro Gly
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC.ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..10

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= “Xaa en la posición 1 indica ácido piroglutámico. Esta secuencia es GnRH II de gallina”.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO:18:

Xaa	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	Gly
1				5					10