

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 864 124**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/20 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015** **E 18212794 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2020** **EP 3502134**

54 Título: **Proteínas que comprenden regiones de unión, regiones efectoras de la subunidad A de toxina Shiga y motivos señal de localización de retículo endoplasmático carboxi terminal**

30 Prioridad:

11.03.2014 US 201461951110 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.10.2021

73 Titular/es:

**MOLECULAR TEMPLATES, INC. (100.0%)
9301 Amberglen Boulevard, Suite 100
Austin, TX 78729, US**

72 Inventor/es:

**POMA, ERIC;
WILLERT, ERIN;
KIM, JASON y
HIGGINS, JACK**

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 864 124 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas que comprenden regiones de unión, regiones efectoras de la subunidad A de toxina Shiga y motivos señal de localización de retículo endoplasmático carboxi terminal

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a proteínas que comprenden regiones de unión para mediar en el reconocimiento celular, regiones efectoras de la toxina Shiga y motivos señal de localización de retículo endoplasmático carboxi terminal, que están unidos a un material exógeno adicional, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas de esta invención tienen usos, por ejemplo para la eliminación selectiva de tipos de células específicas, liberación de materiales exógenos en el interior de las células diana, marcaje de los compartimentos subcelulares de las células diana, y como moléculas terapéuticas para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluyendo cánceres, tumores, trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas.

ANTECEDENTES

El desarrollo de proteínas de fusión sintéticas a partir de las toxinas que son eficaces como agentes terapéuticos ha desafiado a los científicos durante décadas (Pastan I et al, Annu Rev Med. 58: 221-37 (2007)). Un obstáculo es que los restos de toxina enzimáticos de proteínas citotóxicas sintéticas derivados de las toxinas bacterianas y de plantas deben llegar a sus sustratos diana citosólicos con el fin de eliminar las células. Para muchas proteínas citotóxicas recombinantes, la potencia de la citotoxicidad depende de la eficacia de la molécula en el enrutamiento intracelular (Pirie C et al, J Biol Chem 286: 4165-72 (2011)); sin embargo, la comprensión de cómo las toxinas dirigen su propio transporte intracelular desde los endosomas al citosol sigue siendo un reto para la investigación científica (Antignani A, D Fitzgerald, Toxinas 5: 1486-502 (2013)).

Las toxinas naturales o fragmentos de toxinas truncadas se han ligado o fusionado a dominios de inmunoglobulinas o ligandos de receptor a través de conjugación química o técnicas de modificación de proteínas recombinante con la esperanza de crear moléculas terapéuticas dirigidas a las células (Moolten F, Cooperband S, Science 169: 68-70 (1970); Thorpe P y otros, Nature 271: 752-5 (1978); Krolick K et al, Proc Natl Acad Sci USA 77: 5419-23 (1980); Krolick K et al, Cancer Immunol Immunother 12: 39-41 (1981); Blythman H et al, Nature 290: 145-46 (1981); Chaudhary V et al, Nature 339: 394-7 (1989); Strom T et al, Semin Immunol 2: 467-79 (1990); Pastan I et al, Annu Rev Biochem. 61: 331-54 (1992); Foss F et al, Curr Top Microbiol Immunol 234: 63-81 (1998)). Uno de los objetivos de la ingeniería molecular es diseñar moléculas quiméricas con la doble funcionalidad de: 1) liberación de toxinas a tipos de células o puntos específicos dentro de un organismo después de la administración sistémica; y 2) efectuar una citotoxicidad dirigida a células específicas utilizando mecanismos de citotoxicidad potentes eficaces en células eucariotas.

La familia de toxinas Shiga de toxinas proteicas relacionadas, en particular toxinas aisladas de *S. dysenteriae* y *E. coli* se compone de varias toxinas de origen natural que están estructural y funcionalmente relacionadas (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Por ejemplo, la familia de toxinas Shiga abarca la toxina Shiga verdadera (Stx) aislada de *S. dysenteriae* serotipo 1, variantes de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT1 o Stx1 o SLT1 o Stx1) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica y y variantes de la toxina semejante a Shiga 2 (SLT2 o Stx2 o SLT2) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica. SLT1 difiere por sólo un residuo de Stx, y ambas han sido referidas como Verocitotoxinas o Verotoxinas (VTS) (O'Brien A et al, Curr Top Microbiol Immunol. 180: 65-94 (1992)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparten la misma estructura general y mecanismo de acción (Engedal N et al, Microbial Biotech. 4: 32-46 (2011)). Por ejemplo, Stx, SLT-1 y SLT-2 muestran actividad enzimática indistinguible en sistemas libres de células (Head S et al, J Biol Chem. 266: 3617-21 (1991); Tesh V et al, Infect Immun 61: 3392-402 (1993); Brigotti M et al, Toxicon 35: 1431-1437 (1997)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga contienen dominios de reconocimiento que se unen preferentemente a un glicosfingolípido específico presente en la superficie de algunas células huésped y un dominio enzimático capaz de inactivar permanentemente ribosomas una vez dentro de una célula (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)).

Los miembros de la familia de toxinas Shiga son empleados por las bacterias como factores de virulencia durante la infección de un huésped (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). En un huésped infectado, las toxinas Shiga son citotóxicas debido a la potente capacidad de las toxinas para inhibir la síntesis de proteínas y para desencadenar la muerte celular apoptótica (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Los potentes efectos citotóxicos de las toxinas Shiga en las células huésped pueden dar como resultado colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)).

Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparte una estructura proteica común multimérica caracterizada por una disposición A(B)₅ de subunidades de proteína de Shiga (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Cada toxina Shiga se compone de dos subunidades de la proteína, A y B, que se asocian en una disposición A(B)₅ para formar un complejo de proteínas holotoxina. La subunidad A de la toxina Shiga es un monómero de 32 kilodaltons que contiene un dominio enzimático, y la subunidad B de la toxina Shiga es una subunidad de 7,7 kilodaltons que se asocia con otras cuatro subunidades B de la toxina Shiga para formar un pentámero de subunidades B de la toxina

Shiga. El pentámero de subunidades B se asocia con una subunidad A para formar la holotoxina Shiga que tiene aproximadamente 70 kilodaltons (O'Brien A, Holmes, R, *Microbiol Rev* 51: 206-20 (1987)).

Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparten un proceso común para la intoxicación de una célula huésped que puede dividirse en cinco fases principales: la unión a la superficie celular, la endocitosis, el movimiento subcelular retrógrado al retículo endoplasmático, la translocación del retículo endoplasmático al citosol y la inactivación enzimática de los ribosomas en el citosol. En primer lugar, las holotoxinas Shiga se dirigen a las superficies celulares de células huésped específicas por la capacidad de la subunidad B para unirse específicamente al glicosfingolípido globotriaosilceramida Gb3, también conocido como CD77, presente en la parte de la membrana exoplásmica (Ling, H et al, *Biochemistry* 37: 1777-88 (1998); Thorpe C et al, *Infect Immun.* 67: 5985-93 (1999); Soltysk A et al, *J Biol Chem* 277: 5351-59 (2002)). En segundo lugar, las holotoxinas Shiga explotan la maquinaria endocítica de la célula huésped para entrar en la célula huésped, donde las holotoxinas están contenidas inicialmente dentro de los endosomas (Sandvig K et al, *J Cell Biol.* 108: 1331-1343 (1989); Sandvig K et al., *Histochem Cell Biol* 117: 131-141 (2002)). En tercer lugar, las holotoxinas Shiga explotan la maquinaria del transporte intracelular de la célula huésped para alcanzar el retículo endoplásmico y obtener acceso al citosol (Nichols B et al, *J Cell Biol* 153: 529-41 (2001); Lauvrak S et al, *J Cell Sci.* 117: 2321-31 (2004); Saint-Pol A et al, *Dev Cell* 6: 525-38 (2004)). En cuarto lugar, los fragmentos enzimáticamente activos de las holotoxinas Shiga se retrotranslocan desde el lumen del retículo endoplásmico al citosol (Yu M, Haslam D, *Infect Immun* 73: 2524-32 (2005); LaPointe P et al, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005); Falguieres T, Johannes L, *Biol Cell* 98: 125-34 (2006); Tam P, Lingwood C, *Microbiology* 153: 2700-10 (2007)). En quinto lugar, la fracción citosólica de los fragmentos enzimáticamente activos de la toxina Shiga provoca citotoxicidad mediante la inactivación de los ribosomas de la célula huésped (Tam, *Microbiology* 153: 2700-10 (2007)).

Durante el proceso de intoxicación por la toxina Shiga, la subunidad A de la toxina Shiga es escindida proteolíticamente entre un residuo de arginina conservado y un residuo de metionina (por ejemplo, Arg251-Met252 en StxA y SLT-1A) por furina, una endoproteasa de la célula huésped (Garred Ø et al., *J Biol Chem* 270: 10817-21 (1995)). El fragmento amino-terminal de la subunidad A de la toxina Shiga escindida por furina se llama "fragmento A1" de la toxina Shiga (o Stxn-A1, SLTn-A1, SLT-nA1). El fragmento A1 de la toxina Shiga es una proteína de 28 kilodaltons que contiene el dominio catalítico de la toxina Shiga (Fraser M et al, *Nat Struct Biol.* 1: 59-64 (1994)). El mecanismo de citotoxicidad de las toxinas Shiga a las células huésped es predominantemente a través de la potente inactivación catalítica del fragmento A1 de los ribosomas eucariotas y la inhibición en toda la célula de la síntesis de proteínas (Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010)).

El fragmento A1 de la toxina Shiga inhibe la traducción de proteínas mediante su potente actividad de despurinación hacia una nucleobase de adenina universalmente conservada en la posición 4324 en el bucle de alfa-sarcina-ricina del ARN ribosomal 28S de los ribosomas eucariotas (Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010)). Después de inactivar un número umbral de ribosomas, se predice que la célula huésped experimenta una reducción suficiente en la síntesis de proteínas para inducir la muerte celular a través de apoptosis (Iordanov M et al, *Mol Cell Biol.* 17: 3373-81 (1997); Smith W et al., *Infect Immun.* 71: 1497-504 (2003); Lee S et al, *Microbiol Cell* 10: 770-80 (2008); Tesh V, *Future Microbiol* 5: 431-53 (2010)).

Se ha descrito que la potencia de las toxinas A-B es extremadamente alta, de manera que tan poco como una molécula de toxina puede eliminar una célula (Yamaizumi M et al, *Cell* 15: 245-50 (1978); Antignani A, Fitzgerald D, *Toxins* 5: 1486-502 (2013)). Una toxina A-B inactivadora de ribosomas puede paralizar de forma permanente un ribosoma tras otro dentro de la misma célula a una velocidad de aproximadamente 1.500 ribosomas por minuto (Endo Y, Tsurugi K, *Eur J Biochem* 171: 45-50 (1988); Endo Y et al., *J Biol Chem* 263: 8735-9 (1988)). La eficiencia catalítica de esta reacción enzimática (K_{cat}/K_m) está cerca del límite de difusión (Jasheway K et al, *Toxins* 3: 1233-1248 (2011)). Se cree que una sola molécula de la toxina A-B puede inactivar irreversiblemente 300 ribosomas en 35 minutos y es suficiente para eliminar una célula de cáncer (ver Weldon J, Pastan I, *FEBS Journal* 278: 4683-700 (2011)). Este nivel de potencia citotóxica se predice adicionalmente para la subunidad A de la toxina Shiga para la que se ha sugerido que una molécula translocada en el citosol sería suficiente para eliminar una célula (Tam, *Microbiology* 153: 2700-10 (2007)).

Las holotoxinas de la familia de toxinas Shiga se prevé que sean demasiado tóxicas para un uso no dirigido como agente terapéutico (Jain, R, *Tumor physiology and antibody delivery*, *Front Radiat Ther Oncol* 24: 32-46 (1990)). Sin embargo, los miembros de la familia de toxinas Shiga tienen el potencial de diseñarse de forma sintética para aplicaciones terapéuticas racionales mediante alteraciones de la estructura, características y actividades biológicas de la toxina (Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010); Engedal *Microbiana Biotech* 4: 32-46 (2011)). Las holotoxinas Shiga tienen una estructura bipartida compuesta de dos partes modulares unidas de forma no covalente: un resto A que contiene el fragmento A1 enzimáticamente activo y un resto B que contiene sitios de unión a la diana de la superficie celular Gb3. Debido a que las subunidades de la toxina Shiga son modulares, se ha planteado la hipótesis de que las composiciones terapéuticas pueden crearse en base a las estructuras y funciones separadas de los restos A y B (Solicitud de Estados Unidos 20090156417 A1; Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010); Engedal, *Microbial Biotech* 4: 32-46 (2011); solicitud EP 2402367 A1; solicitud de Estados Unidos 20130196928 A1.

El resto A de los miembros de la familia de toxinas Shiga es estable, enzimáticamente activo y citotóxico

independiente de cualquier resto B (Engedal, Microbial Biotech 4: 32-46 (2011)). La subunidad A de la toxina Shiga 1 es catalíticamente activa, capaz de inactivar enzimáticamente ribosomas *in vitro* y citotóxica incluso si está truncada o fusionada con otros dominios de la proteína (Haddad J et al, J Bacteriol. 175: 4970-8 (1993); Al-Jaufy A et al, Infect Immun 62: 956-60 (1994); al-Jaufy A et al, Infect Immun. 63: 3073-8 (1995); LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Di R et al, Toxicon 57: 525-39 (2011)). Los truncamientos de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 son catalíticamente activos, capaces de inactivar los ribosomas enzimáticamente *in vitro* y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Los miembros de la familia de toxinas Shiga aprovechan la maquinaria celular eucariota para entrar y alcanzar el citosol de las células intoxicadas, donde se ejerce su efecto citotóxico. Después de la entrada celular, las toxinas Shiga utilizan mecanismos de transporte retrógrado para moverse desde el compartimento endocitótico al lumen del retículo endoplasmático (Sandvig K et al, J Cell Biol 126: 53-64 (1994); Johannes L et al, J Biol Chem 272: 19554-61 (1997); Rapak A et al, Proc Natl Acad Sci USA 94: 3783-8 (1997)). El transporte retrógrado es el movimiento intracelular de proteínas en la dirección inversa del movimiento más estándar de las proteínas durante su producción y secreción desde las células eucariotas (Pelham H et al, Trends Cell Biol. 2: 183-5 (1992)). En un estudio seminal, se observaron las toxinas Shiga en compartimentos endocitóticos, el complejo de Golgi, el retículo endoplasmático y el citosol de las células eucariotas intoxicadas (Sandvig K et al, Nature 358: 510-12 (1992)).

Las holotoxinas Shiga viajan a través del transporte retrógrado desde los compartimentos endocitóticos al retículo endoplasmático, donde se puede producir la retrotranslocación del fragmento enzimático de toxina Shiga en el citosol. En primer lugar, las toxinas Shiga explotan mecanismos endocitóticos de la célula huésped para alcanzar la red trans-Golgi (Sandvig, J Cell Biol 108: 1331-1343 (1989); Sandvig K et al, J Cell Biol 113: 553-62 (1991)). A continuación, las toxinas Shiga viajan desde el complejo de Golgi al retículo endoplasmático (Simpson J et al, J Biol Chem. 270: 20078-83 (1995)). Finalmente, las toxinas Shiga explotan la maquinaria del retículo endoplasmático para penetrar en el compartimento citosólico a través de la retrotranslocación (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Li S et al, PLoS One. 7: e41119 (2012)). Una vez en el citosol, un fragmento A1 de la toxina Shiga puede paralizar irreversiblemente un ribosoma eucariótico tras otro a través de la potente actividad enzimática del fragmento A1 (Tam P, Microbiology 153: 2700-10 (2007)).

Después de la endocitosis en una célula eucariota, se cree que las moléculas solubles como toxinas se clasifican en los endosomas tempranos para ser 1) recicladas para la secreción, 2) degradadas en el compartimento lisosomal, o 3) retrógradamente transportadas desde orgánulos endocitóticos al complejo de Golgi (Bonifacino J, Hurley J, Curr Opin Cell Biol 20: 427-36 (2008); Pfeffer S, FEBS Lett 583: 3811-6 (2009); Varkouhi et al, J Control Release 151: 220-8 (2011)). Las moléculas pueden ser transportadas desde el cis-Golgi al retículo endoplasmático a través de vesículas, maduración de cisternas o conexiones tubulares (Jackson C, J Cell Sci 122: 443-52 (2009)). Los mecanismos exactos para el tráfico de holotoxinas Shiga al complejo de Golgi no están claros (Sandvig K et al, Toxicon 56: 1181-5 (2010)), pero podría implicar clatrina, túbulos retrógrados, microfilamentos de actina, microtúbulos, y muchos otros factores, tales como anexinas, dinamina, GTPasas pequeñas y sintaxinas.

Numerosas construcciones de toxina Shiga mostraron ser citotóxicas, lo que demuestra que sus dominios enzimáticos alcanzan el citosol de las células intoxicadas para efectuar la eliminación de la célula (Haddad, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993); Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994); al-Jaufy, Infect Immun. 63: 3073-8 (1995); Su et al, Protein Expr Purif 66: 149-57 (2009); Patente de Estados Unidos 7.700.557). Estas construcciones de toxina Shiga son capaces de autodirigir su propio enrutamiento intracelular para finalmente liberar sus fragmentos enzimáticos de las toxinas al citosol después de retrotranslocarse desde el lumen del retículo endoplasmático. Por ejemplo, una proteína de fusión de la subunidad A de Stx A mostró ser citotóxica cuando se administra a las células y la citotoxicidad dependiendo de la función apropiada del complejo de Golgi, presumiblemente para transporte retrógrado (Al-Jaufy, Infect Immun 63: 3073-8 (1995)).

El mecanismo o mecanismos para el transporte retrógrado de toxinas Shiga no se basan ni se benefician del sistema de retención/recuperación del retículo endoplasmático KDEL para ejercer sus efectos citotóxicos (Johannes L et al, J Biol Chem. 272: 19554-61 (1997); Girod A et al, Nat Cell Biol. 1: 423-30 (1999); Jackson M et al, J Cell Sci. 112: 467-75 (1999); Luna A et al, Mol Cell Biol 13: 866-79 (2002); Kano F et al, J Cell Sci 122: 2218-27 (2009)). La técnica anterior demuestra que las toxinas Shiga no requieren ningún motivo señal de la familia KDEL para funcionar como una citotoxina. A diferencia de otras toxinas, tales como exotoxina de *Pseudomonas* y la toxina del cólera, las toxinas Shiga alcanzar el retículo endoplasmático a través de una vía de transporte retrógrado que no implica el uso de un motivo señal de la familia KDEL (Kano F et al, J Cell Sci 122: 2218-27 (2009)). Además, la sobreexpresión de los receptores de KDEL aumentó la citotoxicidad por ricina pero no alteró la citotoxicidad de la toxina Shiga (Jackson, J Cell Sci 112: 467-75 (1999)). Por último, el tratamiento de células con anticuerpos contra el receptor de KDEL para inhibir el sistema de recuperación de KDEL da lugar a la protección de las células contra intoxicación por *Pseudomonas*, pero no tiene efecto sobre la intoxicación por toxina Shiga (Kreitman R, Pastan I, Biochem J 307: 29-37 (1995)).

El transporte retrógrado de toxinas Shiga desde compartimentos endocitóticos al retículo endoplasmático es completamente independiente de los receptores de KDEL y no depende de vesículas recubiertas con COPI. Esto está en marcado contraste con otras toxinas, tales como exotoxina de *Pseudomonas* con un motivo señal de REDLK

en su extremo carboxi terminal, la toxina del cólera con un KDEL en su extremo carboxi terminal y la toxina lábil al calor con una secuencia señal RDEL en su extremo carboxi terminal (Chaudhary V et al, Proc Natl Acad Sci USA 87: 308-12 (1990); Lencer W et al, J Cell Biol 131: 951-62 (1995)). La exotoxina de *Pseudomonas* requiere del sistema de retención/recuperación del retículo endoplásmico KDEL para la intoxicación de las células eucariotas (Jackson, J Cell Sci. 112: 467-75 (1999); Bard F et al, J Biol Chem 278, 46601-6 (2003)). La intoxicación por exotoxina de *Pseudomonas* requiere receptores de KDEL vacíos en el complejo de Golgi para el transporte retrógrado y lo más probable requiere también el sistema de vesículas recubiertas con COPI también. Además, se demostró que la citotoxicidad de exotoxina de *Pseudomonas* se puede aumentar mediante la mutación de su RDEL a KDEL (Kreitman, Biochem J 307: 29-37 (1995)). Del mismo modo, la adición del motivo señal KDEL al extremo carboxi terminal de la ricina aumenta la citotoxicidad de una construcción de ricina, probablemente debido a que el motivo señal KDEL aumenta la frecuencia de la entrada de ricina en el citosol (Gales R et al, J Biol Chem 268: 23986-90 (1993)). Sin embargo, las toxinas Shiga difieren de las toxinas que utilizan el sistema de de retención del retículo endoplásmico a través de los motivos señal de tipo KDEL situados en sus extremos carboxi terminales.

La falta de comprensión de cómo las toxinas Shiga dirigen el enrutamiento intracelular dentro de las células intoxicadas hace que el desarrollo de terapias eficaces basadas en la toxina Shiga sea un desafío.

La idea de la unión de una toxina a un dominio de reconocimiento para producir una molécula quimérica que mata selectivamente las células de cáncer no es nueva (Strebhardt K, Ullrich A, Nat Rev Cancer 8: 473-80 (2008)). Por ejemplo, desde los años 70 se han desarrollado inmunotoxinas utilizando tres candidatos de toxinas principales: la toxina de la difteria bacteriana, la exotoxina bacteriana de *Pseudomonas* y toxinas de plantas ejemplificadas por la ricina (Antignani, Toxins 5: 1486-502 (2013)). En 2013, sin embargo, estas tres toxinas permanecieron "entre las mejores opciones para el desarrollo de inmunotoxinas" (Antignani, Toxins 5: 1486-502 (2013)). Hasta la fecha, nadie ha descrito una proteína citotóxica que comprenda una secuencia de aminoácidos derivada de una toxina Shiga combinada con una región de unión dirigida a células y un motivo señal de recuperación del retículo endoplásmico que sea capaz de eliminar específica y selectivamente un tipo de célula diana.

Al-Jauffy et al, Infection and Immunity 62: 956-60 (1994), describe la citotoxicidad de una proteína de fusión subunidad A de toxina Shiga-CD4 a células infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana. Habibi Roudkenar et al, Cell Biology and Toxicology. 22: 213-19 (2006), describe la citotoxicidad selectiva de la proteína STXA1-GM-CSF recombinante en células de cáncer hematopoyéticas. Pastan et al, Annual Review of Medicine 58: 221-37 (2007), proporciona una revisión del tratamiento del cáncer con inmunotoxinas. El documento WO 2014/164693 describe proteínas citotóxicas que comprenden regiones de unión de tipo inmunoglobulina para mediar en el reconocimiento específico de tipos de células y regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga para efectuar citotoxicidad. Johannes et al, The Journal of Biological Sciences. 272: 19554-61 (1997), describe el transporte retrógrado de un fragmento B que contiene KDEL de la toxina Shiga. Jackson et al, Journal of Cell Science 112: 467-75 (1999), describe que el sistema de recuperación KDEL es explotado por la exotoxina A de *Pseudomonas*, pero no por la toxina semejante a Shiga1, durante el transporte retrógrado desde el complejo de Golgi al retículo endoplásmico. Gales et al, The Journal of Biological Chemistry. 268: 23986-90 (1993), describe la adición de una secuencia de recuperación del retículo endoplásmico a la cadena A de ricina que aumenta significativamente su citotoxicidad a células de mamífero.

Sería deseable tener proteínas citotóxicas dirigidas a células que comprendan regiones derivadas de la subunidad A de toxinas Shiga que autodirijan su propio enrutamiento intracelular y expresen una potente citotoxicidad para usos que implican la eliminación selectiva de determinados tipos de células y para su uso como agentes terapéuticos en el tratamiento de una variedad de enfermedades, tales como, por ejemplo, cánceres, tumores, trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas. Por lo tanto, sigue habiendo una necesidad en la técnica de formas de diseñar proteínas citotóxicas que comprendan regiones de la toxina Shiga y regiones de unión dirigidas a células que exhiban un enrutamiento intracelular eficaz para proporcionar una potente citotoxicidad.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una proteína que comprende 1) una región de unión, tal como se define en las reivindicaciones, tal como de inmunoglobulinas; 2) una región efectora de la toxina Shiga, tal como se define en las reivindicaciones, tal como de SLT-1A; y 3) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL, tal como se define en las reivindicaciones, tal como KDEL (SEQ ID NO: 34), en la que la proteína está unida a un material exógeno adicional, tal como se define en las reivindicaciones. La unión de regiones de unión con polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga permitió el diseño del enrutamiento específico del tipo de células de la citotoxicidad de la toxina Shiga y la adición de motivos señal carboxi terminal aumentó la citotoxicidad. La proteína de la invención tiene usos, tales como, por ejemplo, para la eliminación selectiva de células, la liberación de materiales exógenos, como agentes de diagnóstico, y como moléculas terapéuticas para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluyendo cánceres, tumores, anomalías del crecimiento, trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas.

Una proteína de la presente invención comprende (a) una región de unión capaz de unirse específicamente a al

menos una biomolécula diana extracelular, (b) una región efectora de la subunidad A de la toxina Shiga que comprende un polipéptido capaz de exhibir al menos una función de la toxina Shiga seleccionada del grupo que consiste en: internalización celular, enrutamiento subcelular y citotoxicidad; en el que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia que es al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada de entre: (i) aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; (ii) los aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; (iii) los aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o (iv) los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y (c) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL, en la que la proteína está unida a un material exógeno adicional para liberar en una célula físicamente acoplada con la biomolécula diana extracelular unida por dicha proteína, tal como se define en las reivindicaciones.

En ciertas realizaciones, la proteína de la presente invención comprende la región de unión que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: fragmento de anticuerpo de un solo dominio (sdAb), nanoanticuerpo, dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un camélido (fragmento V_HH), dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un pez cartilaginoso, nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento V_{NAR}, fragmento variable de cadena única (scFv), fragmento de anticuerpo variable (Fv), fragmento de una región determinante de complementariedad 3 (CDR3), polipéptido FR3-CDR3-FR4 (FR3-CDR3-FR4) restringido, fragmento Fd, dominio inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), fragmento de unión a antígeno (Fab), 10^o dominio de tipo III de fibronectina derivado de fibronectina (10Fn3) (por ejemplo, monocuerpo), dominio de tipo III de tenascina, dominio del motivo de repetición de anquirina (ARD), dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad (dominio A de LDLR o LDLR-A), lipocalina (anticalina), dominio Kunitz, dominio Z derivado de Proteína A, dominio derivado de gamma B cristalina, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d (afitina), dominio SH2 derivado de Fyn, miniproteína, andamios estructurales de dominio del tipo lectina de tipo C, mimético de anticuerpo manipulado y cualquier homólogo genéticamente manipulado de cualquiera de los anteriores que retienen la funcionalidad de unión.

Para ciertas realizaciones, mediante la administración de la proteína de la presente invención a una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína, la proteína es capaz de causar la muerte de la célula. En ciertas realizaciones adicionales, tras la administración de la proteína de la invención a dos poblaciones diferentes de tipos de células que se diferencian con respecto a la presencia o el nivel de una biomolécula diana extracelular, la proteína es capaz de causar la muerte celular de los tipos de células acoplados físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína citotóxica en un CD₅₀ que es al menos tres veces menor que el CD₅₀ observado para los tipos de células que no se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína. Para ciertas realizaciones, mediante la administración de la proteína de la invención a una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente a biomoléculas diana extracelulares de la región de unión de la proteína y una segunda población de células cuyos miembros no están físicamente acoplados a ninguna biomolécula diana extracelular de la región de unión, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a células a los miembros de dicha primera población de células con respecto a los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor. Para ciertas realizaciones, mediante la administración de la proteína de la invención a una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente a una cantidad significativa de la biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína y a una segunda población de células cuyos miembros no están acoplados físicamente a una cantidad significativa de alguna biomolécula diana extracelular de la región de unión, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a células a los miembros de dicha primera población de células con respecto a los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor. Para ciertas realizaciones, mediante la administración de la proteína de la invención a una primera población de células positivas de biomolécula diana, y a una segunda población de células cuyos miembros no expresan una cantidad significativa de una biomolécula diana de la región de unión de la proteína en una superficie celular, el efecto citotóxico de la proteína a los miembros de la primera población de células con respecto a los miembros de la segunda población de células es al menos 3 veces mayor.

En ciertas realizaciones, la región de unión está diseñada o seleccionada por su capacidad para unirse a la biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD74, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, CD44, endoglin, proteína activada por fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, CD133, EpCAM, CEA, gpA33, mucina, TAG-72, receptor transmembrana de proteína tirosina quinasa (ROR1 o NTRKR1), anhidrasa carbónica IX, proteína de unión a folato, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido Lewis-Y2, VEGFR, Alfa Vbeta3, Alfa5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANK, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, beta-catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART-1/MelanA, gp100, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus de Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfa-fetoproteína, 17-A1, antígeno de tumor de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεRIa, galectina-9, mrp-14, ligando de muerte programa 1 (PD-L1), Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, CD193, TLR4, FcεRIa, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD15, CD33,

CD64, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, cD11a-c, GITRL, molécula MHC Clase I (opcionalmente complejada con el péptido), molécula MHC Clase II (opcionalmente complejada con el péptido), CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2, CD11c, CD123 y cualquier fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores.

En ciertas realizaciones, la proteína de la presente invención comprende la región efectora de la toxina Shiga que comprende o consiste en los aminoácidos de 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones adicionales, la proteína de la presente invención comprende la región efectora de la toxina Shiga que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones adicionales, la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones adicionales, la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones, la proteína de la presente invención comprende el motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi-terminal seleccionado del grupo que consiste en: KDEL (SEQ ID NO: 34), HDEF (SEQ ID NO: 35), HDEL (SEQ ID NO: 36), RDEF (SEQ ID NO: 37), RDEL (SEQ ID NO: 38), WDEL (SEQ ID NO: 39), YDEL (SEQ ID NO: 40), HEEF (SEQ ID NO: 41), HEEL (SEQ ID NO: 42), KEEL (SEQ ID NO: 43), REEL (SEQ ID NO: 44), KAEL (SEQ ID NO: 45), KCEL (SEQ ID NO: 46), KFEL (SEQ ID NO: 47), KGEL (SEQ ID NO: 48), KHEL (SEQ ID NO: 49), KLEL (SEQ ID NO: 50), KNEL (SEQ ID NO: 51), KQEL (SEQ ID NO: 52), KREL (SEQ ID NO: 53), KSEL (SEQ ID NO: 54), KVEL (SEQ ID NO: 55), KWEL (SEQ ID NO: 56), KYEL (SEQ ID NO: 57), KEDL (SEQ ID NO: 58), KIEL (SEQ ID NO: 59), DKEL (SEQ ID NO: 60), FDEL (SEQ ID NO: 61), KDEF (SEQ ID NO: 62), KKEL (SEQ ID NO: 63), HADL (SEQ ID NO: 64), HAEL (SEQ ID NO: 65), HIEL (SEQ ID NO: 66), HNEL (SEQ ID NO: 67), HTEL (SEQ ID NO: 68), KTEL (SEQ ID NO: 69), HVEL (SEQ ID NO: 70), NDEL (SEQ ID NO: 71), QDEL (SEQ ID NO: 72), REDL (SEQ ID NO: 73), RNEL (SEQ ID NO: 74), RTDL (SEQ ID NO: 75), RTEL (SEQ ID NO: 76), SDEL (SEQ ID NO: 77), TDEL (SEQ ID NO: 78), SKEL (SEQ ID NO: 79), STEL (SEQ ID NO: 80), y EDEL (SEQ ID NO: 81).

En ciertas realizaciones, la proteína de la presente invención comprende la región de unión que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 2-241 según cualquiera de SEQ ID NOs: 4-16.

En ciertas realizaciones, la proteína de la presente invención comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 4-33.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden una región efectora de la toxina Shiga que comprende una mutación con relación a una subunidad A natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia la actividad enzimática de la región efectora de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la mutación se selecciona de al menos una eliminación, inserción o sustitución de residuo de aminoácido que reduce o elimina la citotoxicidad de la región de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la proteína comprende una mutación que reduce o elimina la actividad catalítica pero retiene otras funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como, por ejemplo, la promoción de la internalización celular y/o dirección del enrutamiento intracelular. En ciertas realizaciones, la mutación se selecciona de al menos una sustitución de residuo de aminoácido, tal como, por ejemplo, A231E, R75A, Y77S, Y114S, E167D, R170A, R176K y/o W203A en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de la presente invención, y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se define en las reivindicaciones.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una composición de diagnóstico que comprende una proteína de la invención y un agente promotor de detección, tal como se define en las reivindicaciones. La composición de diagnóstico puede ser utilizada para la recogida de información, tal como información útil para el diagnóstico de un tipo de célula, tejido, órgano, enfermedad, trastorno, afección y/o paciente.

La descripción proporciona polinucleótidos capaces de codificar una proteína descrita en el presente documento, así como un vector de expresión que comprende un polinucleótido descrito en el presente documento y células huésped que comprenden un vector de expresión descrito en el presente documento. Las células huésped que comprenden un vector de expresión se pueden usar, por ejemplo, en los procedimientos para producir una proteína descrita en el presente documento o un componente de polipéptido o fragmento del mismo mediante la expresión recombinante.

La descripción proporciona además un sistema para conferir una mejor citotoxicidad a una proteína que comprende la etapa de añadir un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático carboxi-terminal de un miembro de la familia KDEL a un extremo carboxi terminal del componente de proteína o polipéptido de la proteína, en el que la proteína comprende (a) una región de unión capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular y (b) una región efectora de la toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para eliminar una célula que comprende la etapa de poner en contacto la célula con una proteína de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. En realizaciones adicionales de los procedimientos de eliminación de células, el procedimiento es capaz de eliminar selectivamente una célula o células y/o tipos de células preferentemente sobre otra célula o células y/o tipos de células cuando se pone en contacto una mezcla de células que se diferencian con respecto a la presencia extracelular y/o nivel de expresión de una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína.

La presente invención proporciona además una proteína de la invención o composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección se selecciona de: un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario o infección microbiana. En ciertas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza-cuello, cáncer hematológico, cáncer de riñón-tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer de útero. En ciertas realizaciones, el trastorno inmunitario es un trastorno inmunitario asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, y vasculitis.

La descripción proporciona el uso de cualquier composición descrita en el presente documento para el tratamiento o prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento y/o trastorno inmunitario. Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una proteína de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención para usar en el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario y/o infección microbiana. Entre ciertas realizaciones de la presente descripción está el uso de una proteína descrita en este documento y/o composición farmacéutica de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario o infección microbiana.

La proteína de la invención está unida a un material exógeno adicional para liberar en una célula acoplada físicamente con la biomolécula diana extracelular por la proteína de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para la liberación de material exógeno al interior de una célula que comprende poner en contacto la célula con una proteína de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones; o una composición de diagnóstico de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones; en la que la célula se acopla físicamente con la biomolécula diana extracelular unida por la proteína. La presente descripción proporciona además un procedimiento para la liberación de material exógeno al interior de una célula o células en un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente una proteína descrita en el presente documento (con o sin actividad citotóxica), en el que la célula o células diana se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular de la proteína.

La presente invención también proporciona el uso de una proteína de la presente invención, una composición farmacéutica de la presente invención, o una composición de diagnóstico de la presente invención en el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad, un trastorno o afección, tal como se ha definido en las reivindicaciones. La presente invención también proporciona una proteína de la presente invención, una composición farmacéutica de la presente invención o una composición de diagnóstico de la presente invención para su uso en el diagnóstico, pronóstico o caracterización *in vivo* de una enfermedad, trastorno o afección, tal como se define en las reivindicaciones. Entre ciertas realizaciones de la presente divulgación se encuentra un procedimiento para usar una proteína descrita en el presente documento que comprende un agente promotor de detección y/o una composición descrita en este documento (por ejemplo, una composición de diagnóstico) para la recopilación de información útil en el diagnóstico, pronóstico o caracterización de una enfermedad, trastorno o afección. Entre ciertas realizaciones de la presente divulgación se encuentra el procedimiento de detección de una célula usando una proteína y/o composición de diagnóstico descrita en este documento que comprende las etapas de poner en contacto una célula con la proteína y/o composición de diagnóstico y detectar la presencia de dicha molécula dirigida a la célula y/o composición de diagnóstico. En ciertas realizaciones de la divulgación, la etapa de poner en contacto la(s) célula(s) se produce *in vitro*. En ciertas realizaciones de la divulgación, la etapa de poner en contacto la(s) célula(s) se produce *in vivo*. En ciertas realizaciones de la divulgación, la etapa de detectar la(s) célula(s) se produce *in vitro*. En ciertas realizaciones adicionales de la divulgación, el procedimiento implica la detección de la localización de la proteína en un organismo usando uno o más procedimientos de formación de imágenes después de la administración de la proteína a dicho organismo. Por ejemplo, las proteínas de la invención que incorporan agentes promotores de la detección, tal como se describe en este documento, pueden usarse para caracterizar enfermedades como potencialmente tratables mediante una composición farmacéutica relacionada de la invención. Por ejemplo, las proteínas de la invención, las composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas y composiciones de diagnóstico) de la invención y los procedimientos de la divulgación pueden usarse para determinar si un paciente pertenece a un grupo que responde a una composición

farmacéutica descrita en el presente documento.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención está un kit, tal como se definen en las reivindicaciones, que comprenden: (i) una proteína de la invención, (ii) una composición farmacéutica de la invención, (iii) una composición de diagnóstico de la invención, (iv) un polinucleótido de la invención, (v) un vector de expresión de la invención, o (vi) una célula huésped de la invención, y un reactivo adicional y/o dispositivo de administración farmacéutica y, opcionalmente, instrucciones de uso.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y figuras adjuntas. Los elementos mencionados anteriormente de la invención se pueden combinar individualmente o extraer libremente con el fin de componer otras formas de realización de la invención, sin ninguna afirmación de oposición a dicha combinación o extracción en lo sucesivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la disposición general de las proteínas de la invención con "N" y "C" indicando un extremo amino terminal y carboxi terminal, respectivamente, de la proteína o un componente de polipéptido de la proteína.

La **Figura 2** muestra gráficamente que α HER2scFv::SLT-1A::KDEL exhibió una citotoxicidad específica del tipo de célula diana mejorada en comparación con α HER2scFv::SLT-1A que carecía un motivo señal de KDEL. El porcentaje de viabilidad de las células se representó sobre el logaritmo en base 10 de la concentración de proteína citotóxica.

La **Figura 3** muestra imágenes de microscopía de la localización subcelular de α HER2scFv::SLT-1A y α HER2scFv::SLT-1A::KDEL. Las imágenes mostraron ambas proteínas citotóxicas que entraron en células diana en una hora desde la administración.

La **figura 4** muestra gráficamente una citotoxicidad específica del tipo de célula diana mejorada de la proteína α CD38scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con la proteína α CD38scFv::SLT-1A que carecía del motivo señal de KDEL. El porcentaje de viabilidad de las células se representó sobre el logaritmo en base 10 de la concentración de proteína citotóxica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

A fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definen a continuación. Se pueden encontrar definiciones adicionales dentro de la descripción detallada de la presente invención.

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, los términos "un", "una" y "el/la" incluyen tanto los referentes singular y plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" cuando se refiere a dos especies, A y B, significa al menos uno de A y B. Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" cuando hace referencia a más de dos especies, tales como A, B, y C, significa al menos uno de A, B, o C, o al menos uno de cualquier combinación de A, B, o C (con cada especie en posibilidad singular o múltiple).

A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se entenderán que implican la inclusión de un número entero (o componentes) o grupo de números enteros (o componentes) indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero (o componentes) o grupo de números enteros (o componentes).

En toda esta memoria descriptiva, el término "que incluye" se usa para significar "que incluye, pero no limitado a". "Que incluye" y "que incluye, pero no limitado a" se utilizan indistintamente.

El término "residuo de aminoácido" o "aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido. El término "polipéptido" incluye cualquier polímero de aminoácidos o residuos de aminoácidos. El término "secuencia de polipéptido" se refiere a una serie de aminoácidos o residuos de aminoácidos que componen físicamente un polipéptido. Una "proteína" es una macromolécula que comprende uno o más polipéptidos o "cadenas" de polipéptido. Un "péptido" es un pequeño polipéptido de tamaño de menos de un total de 15-20 residuos de aminoácidos. El término "secuencia de aminoácidos" se refiere a una serie de aminoácidos o residuos de aminoácidos que comprenden físicamente un péptido o polipéptido dependiendo de la longitud. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de polipéptidos y proteínas descritas en este documento se escriben de izquierda a derecha representando su orden de un extremo amino terminal a un extremo carboxi terminal.

- 5 Los términos "aminoácido", "residuo de aminoácido", "secuencia de aminoácidos", o secuencias de polipéptidos incluyen aminoácidos de origen natural (incluyendo isómeros L y D) y, a menos que se limite de otro modo, también incluyen análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los aminoácidos de origen natural, tales como selenocisteína, pirrolisina, N-formilmetionina, gamma-carboxiglutamato, hidroxiprolinahipusina, ácido pirolutámico y selenometionina. Los aminoácidos referidos en este documento por designaciones taquigráficas se indican en la Tabla A:

Tabla A: Nomenclatura de aminoácidos

Nombre	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico o aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico o glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

- 10 La frase "sustitución conservativa" con respecto a un polipéptido, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos del polipéptido que no altera sustancialmente la función y la estructura del polipéptido general (véase Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (WH Freeman and Company, Nueva York (2ª ed., 1992)).
- 15 Tal como se usa en el presente documento, los términos "expresado", "que expresa", o "expresa", y las variantes gramaticales de los mismos, se refieren a la traducción de un polinucleótido o ácido nucleico en un polipéptido o proteína. Los polipéptidos o proteínas expresadas pueden permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o secretarse en un espacio extracelular.
- 20 Tal como se usa en el presente documento, las células que expresan una cantidad significativa de una biomolécula diana extracelular al menos una superficie celular son "células positivas diana" o "células diana+" y son células acopladas físicamente a la biomolécula diana extracelular especificada.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el símbolo "α" es la abreviatura de una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a la biomolécula después del símbolo. El símbolo "α" se utiliza para referirse a la característica funcional de una región de unión de tipo inmunoglobulina en base a su capacidad de unirse a la biomolécula después del símbolo.
- 30 El símbolo "α:" significa las regiones de polipéptidos antes y después de que se unan físicamente entre sí para formar un polipéptido continuo.
- 35 El término "citotoxicidad selectiva" con respecto a la actividad citotóxica de una proteína citotóxica se refiere a los niveles relativos de citotoxicidad entre una población de células diana y una población de células no diana observadas, que puede ser expresada como una relación de la concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para un tipo de célula diana sobre la CD₅₀ para un tipo de célula no diana para mostrar preferencialidad de eliminación celular del tipo de célula diana.
- 40 Para los propósitos de la presente invención, el término "efector" significa proporcionar una actividad biológica, tal como citotoxicidad, señalización biológica, catálisis enzimática, enrutamiento subcelular y/o unión intermolecular, que da lugar al reclutamiento de un factor o factores y/o efecto o efectos alostéricos.
- Para los propósitos de la presente invención, la frase "derivado de" significa que la región de polipéptido comprende secuencias de aminoácidos halladas originalmente en una proteína y que ahora pueden comprender adiciones, deleciones, truncamientos u otras alteraciones de la secuencia original, de manera que la función global y estructura

se conservan sustancialmente.

Para los propósitos de la presente invención, una función efectora de la toxina Shiga es una actividad biológica conferida por una región de polipéptido derivada de una subunidad A de la toxina Shiga. Los ejemplos no limitativos de funciones efectoras de la toxina Shiga incluyen la internalización celular, enrutamiento subcelular, actividad catalítica y la citotoxicidad. Las actividades catalíticas de la toxina Shiga incluyen, por ejemplo, la inactivación de ribosomas, inhibición de la síntesis de proteínas, la actividad de N-glicosidasa, actividad de polinucleótido:adenosina glicosidasa, la actividad de la ARNasa y la actividad ADNasa. Las RIPs pueden despurinar ácidos nucleicos, polinucleósidos, polinucleótidos, ARNr, ADNss, ADNds, ARNm (y poliA), y ácidos nucleicos virales (Barbieri L et al, Biochem J 286: 1-4 (1992); Barbieri L et al, Nature 372: 624 (1994); Ling J et al, FEBS Lett 345: 143-6 (1994); Barbieri L et al, Biochem J 319: 507-13 (1996); Roncuzzi L, Gasperi-Campani A, FEBS Lett 392: 16-20 (1996); Stirpe F et al, FEBS Lett 382: 309-12 (1996); Barbieri L et al, Nucleic Acids Res. 25: 518-22 (1997); Wang P, Turner N, Nucleic Acids Res 27: 1900-5 (1999); Barbieri L et al, Biochim Biophys Acta 1480: 258-66 (2000); Barbieri L et al, J Biochem 128: 883-9 (2000); Brigotti M et al, Toxicon 39: 341-8 (2001); Brigotti M et al, FASEB J 16: 365-72 (2002); Bagga S et al, J Biol Chem 278: 4813-20 (2003); Picard D et al, J Biol Chem 280: 20069-75 (2005)). Algunas RIPs muestran actividad antiviral y actividad superóxido dismutasa (Erice A et al, Antimicrob Agents Chemother 37: 835-8 (1993); Au T et al, FEBS Lett 471: 169-72 (2000); Parikh B, Turner N, Mini Rev Med Chem. 4: 523-43 (2004); Sharma N et al, Plant Physiol 134: 171-81 (2004)). Las actividades catalíticas de toxinas Shiga se han observado tanto *in vitro* como *in vivo*. Los ensayos para la actividad efectora de la toxina Shiga pueden medir diferentes actividades, tales como, por ejemplo, actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, la actividad de despurinación, la inhibición del crecimiento celular, la citotoxicidad, la actividad de relajación de ADN superenrollado y/o actividad de nucleasa.

Tal como se usa en el presente documento, la retención de la función efectora de la toxina Shiga se refiere a un nivel de actividad funcional de la toxina Shiga, tal como se mide por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad comparable a un control de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje. Para la inhibición de ribosomas, la función efectora de la toxina Shiga función efectora es mostrar una CI_{50} de 10.000 picomolar (pM) o menos. Para la citotoxicidad en un ensayo de eliminación de células positivas de diana, la función efectora de la toxina Shiga es mostrar una CD_{50} de 1.000 nanomolar (nM) o menos, dependiendo del tipo de célula y su expresión de la biomolécula diana extracelular apropiada.

La eficacia y la potencia de las inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina como moléculas citotóxicas están influenciadas por la densidad de su antígeno o antígenos diana sobre una superficie de células diana (véase, por ejemplo Deckert T et al, Blood 103: 2718-26 (2004); Du X et al, Blood 111: 338-43 (2008); Baskar S et al, mAbs 4: 349-61 (2012)), ubicación del epítipo (Pulse O et al, J Immunol 141: 4410-7 (1988); Godal A et al, en J Cancer 52: 631-5 (1992); Yazdi P et al, Cancer Res. 55: 3763-71 (1995)), velocidad de internalización de la molécula citotóxica unida a la superficie (ver por ejemplo, Du X et al, Cancer Res 68: 6300-5 (2008)), y el itinerario intracelular (Tortorella L et al, PLoS One. 7: e47320 (2012)).

La representación de la superficie celular y/o la densidad de una biomolécula diana extracelular determinada puede influir en las aplicaciones para las que pueden utilizarse más adecuadamente ciertas proteínas de la presente invención. Las diferencias en la representación de la superficie celular y/o la densidad de una biomolécula diana determinada entre las células pueden alterar la internalización y/o la citotoxicidad de una proteína determinada de la invención, tanto cuantitativa como cualitativamente. La representación de la superficie celular y/o la densidad de una biomolécula diana determinada pueden variar mucho entre las células positivas de la biomolécula diana o incluso en la misma célula en diferentes puntos en el ciclo celular o la diferenciación celular. La representación de la superficie celular total de una biomolécula diana determinada en una célula particular o población de células se puede determinar usando procedimientos conocidos para el experto, tales como procedimientos de citometría de flujo de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

Introducción

La presente invención resuelve los problemas de diseño de proteínas que comprenden regiones derivadas de la subunidad A de toxinas Shiga unidas a las regiones de polipéptidos heterólogos, tales como regiones de unión para el reconocimiento de células, cuando se desea la translocación de la proteína a cierto compartimento o compartimentos intracelulares, por ejemplo al retículo endoplásmico y/o citosol. La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la adición de motivos señal de la familia de KDEL al carboxilo terminal de la región de la toxina derivada de la subunidad A de la toxina Shiga dentro de una proteína citotóxica mejoraba la citotoxicidad. Este descubrimiento contradice los resultados de investigaciones anteriores publicadas en la literatura científica (Jackson M et al, J Cell Sci. 112: 467-75 (1999)). Como se describe en más detalle en los ejemplos, la adición de motivos señal de retención del retículo endoplásmico a los carboxilo terminales de proteínas citotóxicas permitía el diseño del reconocimiento del tipo de célula de citotoxicidad más potente de la toxina Shiga.

Anteriormente, se observó que las construcciones de fusión de subunidad A de la toxina Shiga eran citotóxicas y presumiblemente capaces de autodirigir su propio enrutamiento intracelular para la liberación de un fragmento de toxina enzimáticamente activo al citosol (Al-Jaouy, Infect Immun 62: 956-60 (1994); Al-Jaouy, Infect Immun 63: 3073-8

(1995); Su, Protein Expr Purif 66: 149-57 (2009)). Cuando se crearon múltiples proteínas citotóxicas y se ensayaron con las regiones derivadas de toxina Shiga unidas a regiones de reconocimiento derivadas de inmunoglobulina, estas proteínas diseñadas no mostraron los niveles esperados de citotoxicidad (ver, Ejemplos, infra). Sin embargo, estas proteínas de citotoxicidad reducida exhibieron unión y entrada celular así como actividades enzimáticas similares *in vitro* y afinidades de unión en comparación con variantes más citotóxicas con las mismas regiones de polipéptido unidas en una configuración diferente (véase, Ejemplos, infra; solicitud de patente de Estados Unidos 61/951.121). Este problema inesperado fue resuelto tal como se describe a continuación.

Tal como se describe adicionalmente en los Ejemplos, la toxicidad de las proteínas citotóxicas basadas en la subunidad A de la toxina Shiga mejoró mediante la adición de motivos señal de KDEL a sus extremos carboxi terminales. Esta modificación dio lugar a resultados de eliminación de células significativamente más potentes que los observados en las variantes de las proteínas citotóxicas que carecen de motivos señal de tipo KDEL. Sin embargo, la adición del motivo señal no alteró la actividad catalítica de la región derivada de la toxina Shiga o la cinética de unión de la región de unión. La adición de motivos señal de retención y recuperación del retículo endoplasmático mejoró la citotoxicidad de estas proteínas citotóxicas muy probablemente al dirigir un enrutamiento suficiente intracelular para la liberación eficaz del efector de la toxina Shiga al citosol. La presente invención proporciona una forma específica de diseñar dichas proteínas derivadas de toxina Shiga mediante la adición de un motivo señal de KDEL carboxi terminal a al menos un polipéptido de la proteína con el fin de proporcionar el enrutamiento intracelular deseado y/o citotoxicidad mejorada.

I. Estructura general de las proteínas de la invención

La presente invención proporciona una proteína, comprendiendo la proteína (a) una región de unión para reconocer la célula, tal como se define en las reivindicaciones, (b) una región efectora de la toxina Shiga para proporcionar una o más funciones efectoras de la toxina Shiga (por ejemplo, internalización celular, el enrutamiento intracelular y/o eliminación celular), tal como se define en las reivindicaciones, y (c) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático carboxi terminal para dirigir el enrutamiento subcelular, tal como se define en las reivindicaciones; en la que la proteína está unida a un material exógeno adicional para liberar en una célula acoplada físicamente con la biomolécula diana extracelular unida por dicha proteína. La unión de las regiones de unión que reconocen las células con las regiones derivadas de la subunidad A de toxinas Shiga permite el diseño del reconocimiento específico del tipo de células de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga. Una proteína de la invención comprende una región de unión que puede unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular en asociación física con una célula, tal como una biomolécula diana expresada en la superficie de una célula. Esta estructura general es modular en que cualquier número de diversas regiones de unión pueden unirse a regiones efectoras de la subunidad A de la toxina Shiga y motivos señal de tipo KDEL para producir variaciones de la misma estructura general.

A. Regiones de unión

La región de unión de una proteína de la presente invención es capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular. La región de unión puede comprender uno o más de varios restos peptídicos o polipéptidos, tales como secuencias de péptidos generadas de forma aleatoria, ligandos de origen natural o derivados de los mismos, dominios derivados de inmunoglobulina, andamios estructurales diseñados sintéticamente como alternativas a los dominios de inmunoglobulina y similares. En ciertas realizaciones, una proteína de la invención comprende una región de unión que comprende uno o más polipéptidos capaces de unirse de manera selectiva y específica a una biomolécula diana extracelular.

Hay numerosas regiones de unión conocidas en la técnica que son útiles para dirigir proteínas a tipos de células específicas a través de sus características de unión, tales como ligandos, anticuerpos monoclonales, derivados de anticuerpos diseñados y alternativas a los anticuerpos diseñados.

De acuerdo con un aspecto específico, pero no limitativo, la región de unión de la proteína de la presente invención comprende un ligando natural o derivado del mismo que conserva la funcionalidad de unión a una biomolécula diana extracelular, comúnmente un receptor de superficie celular. Por ejemplo, se pueden usar diversas citocinas, factores de crecimiento y hormonas conocidos en la técnica para dirigir la proteína a la superficie celular de tipos de células específicas que expresan un receptor de citoquinas, receptor de factor de crecimiento o receptor de la hormona afines. Ciertos ejemplos no limitativos de ligandos incluyen (los nombres alternativos se indican entre paréntesis) angiogenina, factores de activación de células B (BAFFs, APRIL), factores estimulantes de colonias (CSF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), interferones, interleuquinas (tales como IL-2, IL-6 e IL-23), factores de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas, factores de crecimiento transformantes (TGF) y factores de necrosis tumoral (TNFs).

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la región de unión comprende un ligando sintético capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular (véase, por ejemplo Liang S et al, J Mol Med. 84: 764-73 (2006); Ahmed S et al, Anal Chem 82: 7533-41 (2010); Kaur K et al, Methods Mol Biol 1248: 239-47 (2015)).

Según un aspecto específico, pero no limitativo, la región de unión puede comprender una región de unión de tipo inmunoglobulina. La "región de unión de tipo inmunoglobulina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una región de polipéptido capaz de unirse a una o más biomoléculas diana, tales como un antígeno o epítipo. Las regiones de unión pueden definirse funcionalmente por su capacidad para unirse a moléculas diana. Las regiones de unión de tipo inmunoglobulina derivan comúnmente de anticuerpo o estructuras similares a anticuerpos; sin embargo, se contemplan andamios estructurales alternativos de otras fuentes dentro del alcance del término.

Las proteínas de inmunoglobulina (Ig) tienen un dominio estructural conocido como un dominio de Ig. Los dominios de Ig varían en longitud desde aproximadamente 70-110 residuos de aminoácidos y poseen un característico pliegue de Ig, en el que típicamente de 7 a 9 hebras beta antiparalelas se disponen en dos láminas beta, que forman una estructura tipo sándwich. El pliegue de Ig se estabiliza mediante interacciones de aminoácidos hidrófobos en las superficies interiores del sándwich y enlaces disulfuro altamente conservados entre residuos de cisteína en las hebras. Los dominios de Ig pueden ser variables (IGV o grupo V), constante (IgC o grupo C) o intermedio (IgI o grupo I). Algunos dominios de Ig pueden estar asociados con una región determinante de la complementariedad (CDR), también llamada "región determinante de la complementariedad", que es importante para la especificidad de la unión de anticuerpos a sus epítopos. Los dominios de tipo Ig también se encuentran en proteínas no inmunoglobulinas y se clasifican sobre esa base como miembros de la superfamilia de Ig de las proteínas. El comité de nomenclatura de genes HUGO (HGNC) proporciona una lista de los miembros de la familia que contiene el dominio de tipo Ig.

Una región de unión de tipo inmunoglobulina puede ser una secuencia de polipéptido de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la secuencia de aminoácidos se ha variado de la de un anticuerpo nativo o un dominio de tipo Ig de una proteína no inmunoglobulina, por ejemplo, mediante ingeniería molecular o la selección mediante cribado de la biblioteca. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante y del cribado de biblioteca *in vitro* en la generación de regiones de unión de tipo inmunoglobulina, los anticuerpos pueden rediseñarse para obtener las características deseadas, tales como el tamaño más pequeño, entrada en la célula u otras mejoras terapéuticas. Las variaciones posibles son muchas y pueden variar desde el cambio de un solo aminoácido al rediseño completo de, por ejemplo, una región variable. Típicamente, los cambios en la región variable se realizarán con el fin de mejorar las características de unión a antígeno, mejorar la estabilidad de la región variable, o reducir la posibilidad de respuestas inmunógenas.

Hay numerosas regiones de unión de tipo inmunoglobulina contempladas como componentes de la presente invención. En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina deriva de una región de unión de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular. En ciertas otras realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido diseñado no derivado de cualquier dominio de inmunoglobulina, pero que funciona como una región de unión a inmunoglobulina al proporcionar una unión de alta afinidad a una biomolécula diana extracelular. Este polipéptido diseñado puede incluir opcionalmente andamios estructurales de polipéptido que comprenden o que consisten esencialmente en las regiones determinantes de la complementariedad de las inmunoglobulinas, tal como se describe en el presente documento.

También hay numerosas regiones de unión de la técnica anterior que son útiles para el enrutamiento de polipéptidos a tipos de células específicas a través de sus características de unión de alta afinidad. En ciertas realizaciones, la región de unión de las presentes proteínas se selecciona entre el grupo que incluye los dominios de anticuerpo de un solo dominio (sdAbs), nanocuerpos, dominios de anticuerpo de cadena pesada derivados de camélidos (fragmentos V_HH), nanoanticuerpos bivalentes, dominios de anticuerpos de cadena pesada derivados de peces cartilaginosos, nuevos receptores de antígenos de inmunoglobulina (IgNAR), fragmentos V_{NAR} , fragmentos variables de cadena única (scFv), fragmentos scFv multimerizantes (diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos), fragmentos scFv biespecíficos en tándem, fragmentos variables (Fv) de anticuerpos estabilizados por puente disulfuro, fragmentos de unión a antígeno (fab) estabilizados con puentes disulfuro que consisten en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 , fragmentos divalente $F(ab')_2$, fragmentos Fd que consisten en la cadena pesada y dominio C_H1 , minicuerpos de cadena única $Fv-C_H3$, minicuerpos biespecíficos, fragmentos de dominios diméricos C_H2 (C_H2D), dominios de unión a antígeno Fc (Fcabs), fragmentos aislados de región determinante de complementariedad 3 (CDR3), región estructural 3 restringida, CDR3, polipéptidos de región estructural 4 (FR3-CDR3-FR4), dominios inmunofarmacéuticos modulares (SMIP), fusiones scFv-Fc, fragmentos scFv multimerizantes (diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos), fragmentos variables (Fv) de anticuerpos estabilizados por puente disulfuro, fragmentos de unión a antígeno (fab) estabilizados con puentes disulfuro que consisten en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 , nanoanticuerpos bivalentes, minicuerpos bivalentes, fragmentos bivalentes $F(ab')_2$ (dímeros Fab), fragmentos V_HH en tándem biespecíficos, fragmentos scFv en tándem biespecíficos, nanoanticuerpos biespecíficos, minicuerpos biespecíficos, y cualesquiera homólogos genéticamente manipulados de los anteriores que retienen su paratopo y función de unión (ver Saerens D et al, Curr Opin Pharmacol. 8: 600-8 (2008); Dimitrov D, MAbs 1: 26-8 (2009); Weiner L, Cell 148: 1081-4 (2012); Ahmad Z et al, Clin Dev Immunol 2012: 980 250 (2012)). Hay una gran variedad de regiones que comprenden los polipéptidos derivados de las regiones constantes de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, los dominios Fc diméricos diseñados, Fcs monoméricos (mFc), scFv-FCS, V_HH -Fcs,

domnios C_H2 , dominios C_H3s monoméricos (mC_H3s), dominios de inmunoglobulina sintéticamente reprogramados, y/o fusiones híbridas de dominios de inmunoglobulina con ligandos (Hofer T et al, Proc Natl Acad Sci USA. 105: 12451-6 (2008); Xiao J et al. , J Am Chem Soc 131: 13.616-13.618 (2009); Xiao X et al, Biochem Biophys Res Commun 387:387-92 (2009); Wozniak-Knopp G et al, Protein Eng Des Sel 23 289-97 (2010); Gong R et al, PLoS ONE. 7: e42288 (2012); Wozniak-Knopp G et al, PLoS ONE 7:.. e30083 (2012); Ying T et al, J Biol Chem 287: 19399-408 (2012); Ying T et al, J Biol Chem 288: 25154-64 (2013); Chiang M et al, J Am Chem Soc 136: 3370-3 (2014); Rader C, Trends Biotechnol. 32: 186-97 (2014); Ying T et al, Biochimica Biophys Acta 1844: 1977-1982 (2014)).

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la región de unión comprende un andamio estructural alternativo diseñado a dominios de inmunoglobulina. Los andamios estructurales alternativos diseñados son conocidos en la técnica que presentan características funcionales similares a las estructuras derivadas de inmunoglobulina, tales como de unión de alta afinidad y específica de biomoléculas diana, y pueden proporcionar características mejoradas a dominios de inmunoglobulina, tales como, por ejemplo, mayor estabilidad o inmunogenicidad reducida. Generalmente, los andamios estructurales alternativos a inmunoglobulinas tienen menos de 20 kilodaltons, consisten en una única cadena polipeptídica, carecen de residuos de cisteína, y exhiben estabilidad termodinámica relativamente alta.

Para ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la región de unión comprende un andamio estructural alternativo seleccionado de entre el grupo que incluye el 10^o dominio diseñado de fibronectina tipo III (10Fn3) derivado de fibronectina (monocuerpos, AdNectins™ o AdNexins™); dominio diseñado de tenascina tipo III derivado de tenascina (Centryns™); polipéptido diseñado que contiene el motivo de repetición de anquirina (DARPin™); dominio A diseñado derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR-A) (Avimers™), lipocalina (anticalinas), dominio Kunitz diseñado derivado de inhibidor de proteasa; dominio Z diseñado derivado de Proteína A (Affibodies™); andamio estructural diseñado derivado de gamma B cristalina o andamio estructural diseñado derivado de ubiquitina (Affilins); polipéptidos derivados de Sac7d (Nanofitins® o afitinas); dominio SH2 diseñado derivado de Fyn (Fynomers®); miniproteínas; andamios estructurales de dominio del tipo lectina de tipo C, mimético de anticuerpo manipulado y cualquier homólogo genéticamente manipulado de cualquiera de los anteriores que retienen su funcionalidad de unión (Wörn A, Plückthun A, J Mol Biol 305: 989-1010 (2001); Xu L et al., Chem Biol 9: 933-42 (2002); Wikman M et al, Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Binz H et al, Nat Biotechnol 23: 1257-1268 (2005); Hey T et al, Trends Biotechnol 23: 514-522 (2005); Holliger P, Hudson P, Nat Biotechnol. 23: 1126-1136 (2005); Gill D, Damle N, Curr Opin Biotech 17: 653-8 (2006); Koide A, Koide S, Methods Mol Biol 352: 95-109 (2007); Byla P et al, J Biol Chem 285: 12096 (2010); Zoller F et al, Molecules 16: 2467-85 (2011)).

Por ejemplo, han sido identificados numerosos andamios estructurales alternativos que se unen al receptor extracelular de HER2 (véase, por ejemplo Wikman M et al, Protein Eng Des Sel. 17: 455-62 (2004); Orlova A et al Cancer Res 66: 4339-8 (2006); Ahlgren S et al, Bioconjug Chem 19: 235-43 (2008); Feldwisch J et al, J Mol Biol 398: 232-47 (2010); patentes de Estados Unidos 5.578.482; 5.856.110; 5.869.445; 5.985.553; 6.333.169 ; 6.987.088; 7.019.017; 7.282.365; 7.306.801; 7.435.797; 7.446.185; 7.449.480; 7.560.111; 7.674.460; 7.815.906; 7.879.325; 7.884.194; 7.993.650; 8.241.630; 8.349.585; 8.389.227; 8.501.909; 8.512.967; 8.652.474; y la solicitud de patente 2011/0059090).

Cualquiera de las regiones de unión anteriores se puede utilizar como un componente de la proteína de la presente invención siempre que el componente de región de unión tenga una constante de disociación de 10⁻⁵ a 10⁻¹² moles/litro, preferiblemente menos de 200 nM, hacia una biomolécula diana extracelular, tal como se describe en el presente documento.

Biomoléculas diana extracelulares

La región de unión de la proteína de la invención es capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular, preferiblemente que está físicamente acoplada a la superficie de un tipo de célula de interés, tal como una célula de cáncer, célula tumoral, célula plasmática, célula infectada, o célula huésped que alberga un patógeno intracelular.

El término "biomolécula diana" se refiere a una molécula biológica, comúnmente una proteína o una proteína modificada por modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, que es capaz de unirse mediante una región de unión para dirigir una proteína a un tipo de célula o localización específica dentro de un organismo. Las biomoléculas diana extracelulares pueden incluir varios epítomos, incluyendo polipéptidos no modificados, polipéptidos modificados por la adición de grupos funcionales bioquímicos y glicolípidos (véase por ejemplo la patente de Estados Unidos 5.091.178; EP 2431743). Es deseable que una biomolécula diana extracelular se internalice endógenamente o se fuerce fácilmente para internalizar tras la interacción con una molécula de la invención.

Para los propósitos de la presente invención, el término "extracelular" con respecto a la modificación de una biomolécula diana se refiere a una biomolécula que tiene al menos una parte de su estructura expuesta al medio extracelular. Las biomoléculas diana extracelulares incluyen componentes de la membrana celular, proteínas de la

zona transmembrana, biomoléculas ancladas a la membrana de las células, biomoléculas unidas a la superficie celular y biomoléculas secretadas.

Con respecto a la presente invención, la frase "acoplada físicamente" cuando se usa para describir una biomolécula diana significa interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan la biomolécula diana, o una parte de la misma, al exterior de una célula, tal como una pluralidad de interacciones no covalentes entre la biomolécula diana y la célula, donde la energía de cada interacción individual es del orden de aproximadamente 1-5 kilocalorías (por ejemplo, enlaces electrostáticos, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, fuerzas hidrófobas, etc.). Todas las proteínas integrales de membrana se pueden encontrar acopladas físicamente a una membrana celular, así como proteínas de membrana periféricas. Por ejemplo, una biomolécula diana extracelular podría comprender una región de la zona transmembrana, un anclaje lipídico, un anclaje de glicolípido, y/o puede asociarse no covalentemente (por ejemplo, a través de interacciones hidrofóbicas no específicas y/o interacciones de unión de lípidos) con un factor que comprende cualquiera de los anteriores.

Las biomoléculas diana extracelular de la región de unión de las proteínas de la invención pueden incluir biomarcadores sobreproporcionalmente o exclusivamente presentes en células cancerosas, células inmunitarias y células infectadas con patógenos intracelulares, tales como virus, bacterias, hongos, priones o protozoos.

Las regiones de unión de las proteínas de la invención pueden diseñarse o seleccionarse en base a numerosos criterios, tales como la expresión específica del tipo de célula de sus biomoléculas diana y/o la localización física de sus biomoléculas diana con respecto a tipos de células específicos. Por ejemplo, ciertas proteínas de la presente invención comprenden dominios de unión capaces de unir dianas de la superficie celular que se expresan exclusivamente por un solo tipo de células a la superficie celular.

La estructura general de las proteínas de la presente invención es modular en que varias regiones de unión diversas se pueden utilizar con la misma región efectora de la toxina Shiga para proporcionar un enrutamiento diverso de varias biomoléculas diana extracelulares y por lo tanto el enrutamiento de la citotoxicidad, la citostasis, agentes de diagnóstico y/o liberación de material exógeno a varios tipos de células diversas.

B. Regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de subunidades A de los miembros de la toxina Shiga Familia

Para los propósitos de la presente invención, la frase "región efectora de la toxina Shiga" se refiere a una región polipeptídica derivada de una subunidad A de la toxina Shiga de un miembro de la familia de toxinas Shiga que es capaz de exhibir al menos una función de la toxina Shiga. Las funciones de toxina Shiga incluyen, por ejemplo, entrada en la célula, deformación de la membrana lipídica, dirección del enrutamiento subcelular, evitar la degradación, inactivar catalíticamente los ribosomas, efectuar la citotoxicidad y efectuar efectos citostáticos.

Un miembro de la familia de toxinas Shiga se refiere a cualquier miembro de una familia de toxinas proteicas de origen natural que están relacionadas estructural y funcionalmente, en particular toxinas aisladas de *S. dysenteriae* y *E. coli* (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Por ejemplo, la familia de toxinas abarca la toxina Shiga verdadera (Stx) aislada de *S. dysenteriae* serotipo 1, variantes de toxina semejante a Shiga 1 (SLT1 o Stx1 o SLT1 o SLT-I) aislados de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica, y variantes de toxina semejante a Shiga 2s (SLT2 o Stx2 o SLT-2) aislados de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica. SLT1 difiere por sólo un residuo de Stx, y ambos han sido referidos como Verocitotoxinas o Verotoxinas (VT) (O'Brien, Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)). Aunque las variantes SLT1 y SLT2 son sólo aproximadamente un 53-60% similares entre sí a nivel de secuencia de aminoácidos, comparten mecanismos de la actividad enzimática y la citotoxicidad comunes a los miembros de la familia de toxinas Shiga (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105- 16 (2010)). Más de 39 toxinas Shiga diferentes se han descrito, tal como los subtipos definidos Stx1a, Stx1c, Stx1d y Stx2a-g (Scheutz F et al, J Clin Microbiol. 50: 2951-63 (2012)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga no se limitan, naturalmente, a ninguna especie bacteriana porque los genes que codifican la toxina Shiga pueden propagarse entre especies bacterianas a través de transferencia horizontal de genes (Strauch E et al, Infect Immun 69: 7588-95 (2001); Zhaxybayeva O., Doolittle W, Curr Biol 21: R242-6 (2011)). Como ejemplo de transferencia entre especies, se descubrió una toxina Shiga en una cepa de *A. haemolyticus* aislada de un paciente (Grothius G et al, J Clin Microbiol. 44: 3838-41 (2006)). Una vez que un polinucleótido que codifica la toxina Shiga entra en una nueva subespecie o especie, la secuencia de aminoácidos de la toxina presumiblemente es capaz de desarrollar ligeras variaciones en la secuencia debido a la deriva genética y/o presión selectiva manteniendo al mismo tiempo un mecanismo de citotoxicidad común a los miembros de la familia de toxinas Shiga (ver Scheutz, J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)).

Las regiones efectoras de la toxina Shiga de la proteína de la invención pueden comprender o consistir esencialmente en un polipéptido derivado de una subunidad A de la toxina Shiga disociada de cualquier forma de su subunidad B de toxina Shiga nativa. Además, las proteínas de la presente invención no comprenden cualquier polipéptido que comprende o que consiste esencialmente en un dominio de unión funcional de una subunidad B de toxina Shiga nativa. Más bien, las regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga están asociadas funcionalmente con regiones de unión heterólogas para efectuar el enrutamiento celular.

En ciertas realizaciones, una región efectora de la toxina Shiga de la proteína de la invención puede comprender o

consistir esencialmente en una subunidad A de la toxina Shiga de longitud completa (por ejemplo, SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2), o SLT-2A (SEQ ID NO: 3)), indicando que las subunidades A de la toxina Shiga natural pueden comprender formas precursoras que contienen secuencias de señal de aproximadamente 22 aminoácidos en sus extremos amino terminales que se eliminan para producir subunidades A de la toxina Shiga madura y son reconocibles para el experto. En otras realizaciones, la región efectora de la toxina Shiga de la proteína de la invención puede comprender o consistir esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga troncada que es más corta que una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa.

Los truncamientos de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 son catalíticamente activos, capaces de inactivar los ribosomas enzimáticamente *in vitro*, y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). El fragmento de subunidad A de la toxina Shiga más pequeño que presenta actividad enzimática completa es un polipéptido compuesto de residuos 1-239 de SLT1A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque el fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que se indicó que retenía la actividad catalítica sustancial fueron los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)), un truncamiento de StxA expresado *de novo* dentro de una célula eucariota requiere sólo hasta el residuo 240 para alcanzar el citosol y ejercer la inactivación catalítica de ribosomas (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Las regiones efectoras de la toxina Shiga pueden comúnmente ser menor que la subunidad A de longitud completa. Se prefiere que la región efectora de la toxina Shiga mantenga la región de polipéptido desde la posición de aminoácido 77 a 239 (SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2)) o el equivalente en otras subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga (por ejemplo, 77 a 238 del (SEQ ID NO: 3)). Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, una región efectora de la toxina Shiga derivada de SLT-1A puede comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 1. Entre otras ciertas realizaciones, una región efectora de la toxina Shiga derivada de StxA puede comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 2, 1 a 241 de SEQ ID NO: 2, 1 a 251 de SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 2. Entre otras ciertas realizaciones, una región efectora de la toxina Shiga derivada de SLT-2 puede comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 3, 1 a 241 de SEQ ID NO: 3, 1 a 251 del SEQ ID NO: 3, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 3.

La invención proporciona además variantes de las proteínas de la invención, en la que la región efectora de la toxina Shiga difiere de una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural hasta en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más residuos de aminoácidos (pero en no más de lo que retiene al menos 85%, 90%, 95%, 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos). Por lo tanto, una región polipeptídica derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga puede comprender adiciones, delecciones, truncamientos, u otras alteraciones de la secuencia original, siempre y cuando al menos 85%, 90%, 95%, 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos se mantenga con respecto a una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural.

Por consiguiente, la región efectora de la toxina Shiga puede comprender o consistir esencialmente en secuencias de aminoácidos que tiene al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98 %, 99%, 99,5% o 99,7% de identidad de secuencia global a una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural, tal como SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2) y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3).

Opcionalmente, una versión de longitud total o troncada de la subunidad A de la toxina Shiga puede comprender una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones, delecciones, inserciones o inversiones). Se prefiere, en ciertas realizaciones de la invención, que la región efectora de la toxina Shiga tenga suficiente identidad de secuencia con una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural para retener la citotoxicidad después de la entrada en una célula, ya sea por procedimientos bien conocidos de transformación, la transfección, la infección o inducción de la célula huésped, o mediante la internalización mediada por la región de unión dirigida a célula unida con la región efectora de la toxina Shiga. Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades A de la toxina Shiga han sido asignadas a los siguientes posiciones de residuos: asparagina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170 y la arginina-176 entre otras (Di, Toxicon 57: 525-39 (2011)). En cualquiera de las realizaciones de la invención, la región efectora de la toxina Shiga puede preferiblemente, pero no necesariamente, mantener uno o más aminoácidos conservados en las posiciones, tales como los que se encuentran en las posiciones 77, 167, 170, y 176 en StxA, SLT-1A o la posición conservada equivalente en otros miembros de la familia de toxinas Shiga que normalmente se requieren para la actividad citotóxica. La capacidad de una proteína citotóxica de la invención para causar la muerte celular, por ejemplo, su citotoxicidad, se puede medir utilizando uno cualquiera o más de una serie de ensayos bien conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones de la proteína de la invención, uno o más residuos de aminoácidos pueden ser mutados, insertados o suprimidos con el fin de aumentar la actividad enzimática de la región efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, la mutación de la posición del residuo de alanina-231 en Stx1A a glutamato aumentó su actividad enzimática *in vitro* (Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)).

En ciertas realizaciones de la proteína de la invención, uno o más residuos de aminoácidos pueden ser mutados o eliminados con el fin de reducir o eliminar la actividad catalítica y/o citotóxica de la región efectora de la toxina

Shiga. La actividad catalítica y/o citotóxica de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede reducirse o eliminarse por mutación o truncamiento. Las posiciones marcadas tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114, y triptófano-203 ehan demostrado ser importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1, y Stx2 (Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci USA. 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al, Biochemistry 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al, Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al. , Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al, Microbiol Immunol. 38: 441-7 (1994); Suhan, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)). La mutación de ambos glutamato-167 y arginina-170 eliminó la actividad enzimática de Slt-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas libre de células (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque utilizando la expresión *de novo* de Slt-I A1 en el retículo endoplásmico, mutando tanto glutamato-167 como arginina-170 o truncándolos a los residuos 1-239 eliminó la citotoxicidad del fragmento Slt-I A1 en ese nivel de expresión (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Tal como se usa en el presente documento, la retención de una función efectora de la toxina Shiga "significativa" se refiere a un nivel de actividad funcional de la toxina Shiga, tal como se mide por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad comparable a un control de polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje. Para la inhibición *in vitro* de ribosoma, una función efectora de la toxina Shiga significativa es mostrar una IC₅₀ de 300 pM o menos dependiendo de la fuente de los ribosomas (por ejemplo, bacterias, arqueas o eucariotas (algas, hongos, plantas o animales)). Esta es una inhibición significativamente mayor en comparación con la IC₅₀ aproximada de 100000 pM para el doble mutante SLT-1A 1-251 catalíticamente inactivo (Y77S/E167D). Para la citotoxicidad en un ensayo de eliminación de células positivas de diana en un cultivo de células de laboratorio, una función efectora de la toxina Shiga significativa es mostrar una CD₅₀ de 100, 50, o 30 nM o menos, dependiendo de la línea celular y su expresión de la biomolécula diana extracelular apropiada. Esta es una citotoxicidad significativamente mayor para la línea celular diana apropiada en comparación con el componente SLT-1A sola, sin una región de unión de reconocimiento celular, que tiene una CD₅₀ de 100-10.000 nM, dependiendo de la línea celular.

Para algunas muestras, los valores exactos, ya sea para IC₅₀ o CD₅₀, podrían ser imposibles de obtener debido a la incapacidad para recoger los puntos de datos requeridos para una curva de ajuste preciso. Valores de IC₅₀ y/o CD₅₀ inexactos no deben considerarse cuando se determina la actividad de la función efectora de la toxina Shiga significativa. Datos insuficientes para adaptar con precisión una curva, tal como se describe en el análisis de los datos de ensayos de la función efectora de la toxina Shiga de ejemplo, tales como, por ejemplo, ensayos descritos en los ejemplos, no deben considerarse como representativos de la función efectora real de la toxina Shiga. Por ejemplo, en teoría, ni IC₅₀ ni CD₅₀ se pueden determinar si no se produce más del 50% de inhibición de ribosomas o muerte celular, respectivamente, en una serie de concentraciones para una muestra determinada.

El fracaso para detectar la actividad en la función efectora de la toxina Shiga puede ser debido a la expresión inadecuada, el plegamiento del polipéptido y/o la estabilidad del polipéptido en lugar de la falta de entrada celular, enrutamiento subcelular y/o actividad enzimática. Los ensayos para las funciones efectoras de la toxina Shiga pueden no requerir mucho de la proteína de la invención para medir cantidades significativas de actividad de la función efectora de la toxina Shiga. En la medida en que una causa subyacente de función efectora baja o nula se determine empíricamente para relacionarse con la expresión o la estabilidad de la proteína, un experto en la técnica puede ser capaz de compensar tales factores utilizando química de proteínas y técnicas de ingeniería molecular conocidas en la técnica, de tal manera que se puede restaurar y medir una actividad efectora funcional de la toxina Shiga. Como ejemplos, la expresión basada en células inadecuada puede ser compensada mediante el uso de diferentes secuencias de control de expresión; el plegamiento y/o estabilidad del polipéptido inadecuados se pueden beneficiar de la estabilización de secuencias terminales, o mutaciones compensatorias en regiones no efectoras que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína, etc. Cuando están disponibles nuevos ensayos para funciones individuales de la toxina Shiga, las regiones o polipéptidos efectores de la toxina Shiga pueden analizarse para cualquier nivel de estas funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como por estar dentro de un número determinada de veces de la actividad un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje. Ejemplos de diferencias de actividad significativas son, por ejemplo, polipéptidos efectores de la toxina Shiga que tienen 1.000 veces o 100 veces o menos la actividad de un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje; o que tienen de 3 veces a 30 veces o más actividad en comparación con un knock-down funcional o polipéptido efector de la toxina Shiga knock-out.

Ciertas funciones efectoras de la toxina Shiga no son fácilmente medibles, por ejemplo, la actividad de enrutamiento subcelular. Actualmente no hay ninguna rutina, ensayo cuantitativo para distinguir si el fallo de un polipéptido efector de la toxina Shiga para ser citotóxico es debido a un enrutamiento subcelular inadecuado, pero en el momento que estas pruebas estén disponibles, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga se pueden analizar para cualquier nivel significativo de enrutamiento subcelular en comparación con el polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje apropiado.

Cabe señalar que incluso si la citotoxicidad de un polipéptido efector de toxina Shiga se reduce en relación con el de tipo salvaje, en la práctica, las aplicaciones que utilizan polipéptidos efectores de la toxina Shiga pueden ser igual o más eficaces que las que utilizan polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje porque las variantes de potencia más elevada pueden exhibir efectos indeseables que se minimizan en variantes de potencia reducida. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje son muy potentes, siendo capaces de eliminar con sólo una

molécula que alcanza el citosol o tal vez se internalizan 40 moléculas. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga con incluso funciones efectoras de la toxina Shiga considerablemente reducidas, tales como, por ejemplo, el enrutamiento subcelular o la citotoxicidad, en comparación con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje todavía puede ser lo suficientemente potente para aplicaciones prácticas que implican la eliminación de células diana y/o la detección de células específicas.

C. Motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático de un miembro de la familia KDEL

Para los propósitos de la presente invención, la frase "motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático", motivo señal de tipo KDEL, o motivo señal se refiere a cualquier miembro de la familia KDEL capaz de funcionar dentro de una célula eucariota para promover la localización subcelular de una proteína al retículo endoplasmático a través de receptores de KDEL.

La secuencia de lisina-asparagina-glutamato-leucina (KDEL) carboxi terminal (SEQ ID NO: 34) es un motivo señal canónico de retención y recuperación del retículo endoplasmático para proteínas solubles en células eucariotas y es reconocida por los receptores de KDEL (véase, Capitani M, Salles M, FEBS Lett 583: 3863-71 (2009), para revisión). La familia KDEL de motivos señal incluye muchos motivos de tipo KDEL, tales como HDEL (SEQ ID NO: 36), RDEL (SEQ ID NO: 38), WDEL (SEQ ID NO: 39), YDEL (SEQ ID NO: 40), HEEL (SEQ ID NO: 42), KEEL (SEQ ID NO: 43), REEL (SEQ ID NO: 44), KFEL (SEQ ID NO: 47), KIEL (SEQ ID NO: 59), DKEL (SEQ ID NO: 60), KDEL (SEQ ID NO: 63), HNEL (SEQ ID NO: 67), HTEL (SEQ ID NO: 68), KTEL (SEQ ID NO: 69) y HVEL (SEQ ID NO: 70), todos los cuales se encuentran en los extremos carboxi terminales de proteínas que se sabe que son residentes del lumen del retículo endoplasmático de organismos de múltiples reinos filogenéticos (Munro S, Pelham H, Cell 48: 899-907 (1987); Raykhel I et al, J Cell Biol. 179: 1193-204 (2007)). La familia de motivos señal de KDEL incluye al menos 46 variantes de polipéptidos mostradas usando construcciones sintéticas (Raykhel, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007)). Los motivos señal de KDEL adicionales incluyen ALEDEL (SEQ ID NO: 82), HAEDEL (SEQ ID NO: 83), HLEDEL (SEQ ID NO: 84), KLEDEL (SEQ ID NO: 85), IRSDEL (SEQ ID NO: 86), ERSTEL (SEQ ID NO: 87), y RPSTEL (SEQ ID NO: 88) (Alanen H et al, J Mol Biol 409: 291-7 (2011)). Un motivo consenso generalizado que representa la mayoría de los motivos señal de KDEL se ha descrito como [KRHQSA]-[DENQ]-E-L (Hulo N et al, Nucleic Acids Res 34: D227-30 (2006)).

Las proteínas que contienen motivos señal de la familia KDEL están unidos por los receptores KDEL distribuidos por todo el complejo de Golgi y transportados al retículo endoplasmático por un mecanismo dependiente de microtúbulos para su liberación en el lumen del retículo endoplasmático (Griffiths G et al, J Cell Biol 127: 1557-74 (1994); Miesenböck G, Rothman J, J Cell Biol 129: 309-19 (1995)). Los receptores KDEL se ciclan dinámicamente entre el retículo endoplasmático y complejo de Golgi (Jackson M et al, EMBO J 9: 3153-62 (1990); Schütze M et al, EMBO J. 13: 1696-1705 (1994)).

Para los propósitos de la presente invención, los miembros de la familia KDEL incluyen motivos señal sintéticos capaces de funcionar dentro de una célula eucariota para promover la localización subcelular de una proteína al retículo endoplasmático a través de receptores KDEL. En otras palabras, algunos miembros de la familia KDEL podrían no estar presentes en la naturaleza o aún no se han observado en la naturaleza, pero se han construido o se pueden construir y verificar empíricamente usando procedimientos conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Raykhel I et al, J Cell Biol. 179: 1193-204 (2007).

Como componente de las proteínas de la invención, el motivo señal de tipo KDEL se encuentra físicamente, orientado, o dispuesto dentro de la proteína de tal manera que está en un carboxi-terminal de un polipéptido.

Para los fines de la presente invención, el orden o la orientación específica no es fijo para la región efectora de la toxina Shiga y la región de unión en relación a la una a la otra o toda la proteína (ver por ejemplo, Figura 1). Los componentes de las proteínas de la presente invención pueden estar dispuestos en cualquier orden siempre que las actividades deseadas de la región de unión y la región efectora de la toxina Shiga no se eliminen. Las actividades deseadas incluyen proporcionar a la proteína la capacidad, por ejemplo, de unirse a células que expresan la diana, inducir la internalización celular, causar citostasis, causar citotoxicidad y/o liberar materiales exógenos a los interiores de las células.

En las realizaciones anteriores de proteínas de la invención, las regiones de unión, las regiones efectoras de la toxina Shiga (que pueden ser citotóxicas y/o albergar una o más mutaciones que reducen o eliminan la actividad catalítica y/o citotoxicidad), y el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático pueden estar directamente unidos entre sí y/o unidos adecuadamente entre sí a través de una o más secuencias de polipéptidos intermedios, tales como con uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

D. Uniones que conectan componentes de polipéptido de la proteína de la invención y/o sus subcomponentes

Los componentes de polipéptidos y/o proteínas individuales de la proteína de la invención, por ejemplo, las regiones de unión y regiones efectoras de la toxina Shiga (que pueden ser citotóxicas y/o albergar una o más mutaciones que

alteran, reducen o eliminan la actividad catalítica y/o citotoxicidad), puede estar adecuadamente unidas entre sí mediante uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritas en el presente documento. Los subcomponentes de polipéptidos individuales de las regiones de unión, por ejemplo, regiones CDR y/o ABR, pueden estar adecuadamente unidos entre sí mediante uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento (véase, por ejemplo Weissner N, Hall J, *Biotechnol Adv* 27: 502-20 (2009); Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev.* 65: 1357-1369 (2013)). Los componentes de polipéptidos de la proteína de la invención, por ejemplo, regiones de unión multicadenas, pueden estar adecuadamente unidos entre sí u otros componentes del polipéptido a través de uno o más enlazadores conocidos en la técnica. Los componentes peptídicos de la proteína de la invención, por ejemplo, motivos señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático de la familia KDEL, puede estar adecuadamente ligados a otro componente a través de uno o más enlazadores, tales como un enlazador proteico, que son bien conocidos en la técnica.

Los enlazadores adecuados son generalmente aquellos que permiten que cada componente de polipéptido de la proteína de la invención se pliegue con una estructura tridimensional muy similar a los componentes polipeptídicos producidos individualmente sin ningún enlazador u otro componente. Los enlazadores adecuados incluyen aminoácidos individuales, péptidos, polipéptidos, y enlazadores que carecen de cualquiera de los anteriores, tales como, por ejemplo, varias cadenas de carbono no proteináceas, ya sean ramificadas o cíclicas (véase, por ejemplo Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev.* 65: 1357 -69 (2013)).

Los enlazadores adecuados pueden ser proteico y comprender uno o más aminoácidos, péptidos y/o polipéptidos. Los enlazadores proteicos son adecuados para proteínas de fusión recombinantes y conjugados unidos químicamente. Un enlazador proteico tiene típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, tales como, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 o de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 residuos de aminoácidos. La longitud del enlazador seleccionado dependerá de una variedad de factores, tales como, por ejemplo, la propiedad o propiedades deseadas para las que se selecciona el enlazador (véase, por ejemplo Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev.* 65: 1357-1369 (2013)).

Los enlazadores adecuados pueden ser no proteínico, tales como, por ejemplo, enlazadores químicos (véase, por ejemplo Dosio F et al, *Toxins* 3: 848-83 (2011); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)). Se pueden usar varios enlazadores no proteínicos conocidos en la técnica para enlazar regiones de unión a las regiones efectoras de la toxina Shiga, tales como enlazadores comúnmente usados para conjugar polipéptidos derivados de inmunoglobulina a polipéptidos heterólogos. Por ejemplo, las regiones de polipéptidos de las proteínas de la presente invención pueden unirse usando las cadenas laterales funcionales de sus residuos de aminoácidos y restos de carbohidrato, tales como, por ejemplo, un grupo carboxi, amina, sulfhidrilo, ácido carboxílico, carbonilo, hidroxilo y/o anillo cíclico. Por ejemplo, se pueden usar enlaces disulfuro y enlaces tioéter para unir dos o más polipéptidos (véase, por ejemplo Fitzgerald D et al, *Bioconjugate Chem.* 1: 264-8 (1990); Pasqualucci L et al, *Haematologica* 80: 546-56 (1995)). Además, se pueden utilizar residuos de aminoácidos no naturales con otras cadenas laterales funcionales, tales como grupos cetona (véase, por ejemplo Sun S et al, *Chembiochem* 18 jul (2014); Tian F et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 1766-1771 (2014)). Los ejemplos de enlazadores químicos no proteicos incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato, S-(N-succinimidil) tioacetato (SATA), N-succinimidil-oxicarbonil-cu-metil-a-(2-piridilditio) tolueno (SMPT), N-succinimidil 4-(2-piridilditio) pentanoato (SPP), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano carboxilato (SMCC o MCC), sulfosuccinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato, 4-succinimidil-oxicarbonil- α -(2-piridilditio) tolueno, sulfosuccinimidil-6-(α -metil- α -(piridilditio)-toluamido) hexanoato, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato (SPDP), succinimidil 6(3-(2-piridilditio)-propionamido) hexanoato, sulfosuccinimidil 6(3-(2-piridilditio)-propionamido) hexanoato, maleimidocaproil (MC), maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonilo (MC-vc-PAB), éster N-hidroxisuccinimida de ácido 3-maleimidobenzoico (MBS), derivados de alfa alquilo, sulfoNHS-ATMBA (sulfosuccinimidil N-[3-(acetiltio)-3-metilbutiril-beta-alanina]), sulfodiclofenol, 2-iminotiolano, 3-(2-piridilditio)-propionilhidrazida, reactivo de Ellman, ácido diclorotriazínico y S-(2-tiopiridil)-L-cisteína (véase, por ejemplo Thorpe P et al, *Eur J Biochem.* 147: 197-206 (1985); Thorpe P et al, *Cancer Res.* 47: 5924-31 (1987); Thorpe P et al, *Cancer Res.* 48: 6396-403 (1988); Grossbard M et al, *Blood* 79: 576-85 (1992); Lui C et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8618-23 (1996); Doronina S et al, *Nat Biotechnol* 21: 778-84 (2003); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)).

Los enlazadores adecuados, sean proteínicos o no proteínico, pueden incluir, por ejemplo, enlazadores sensibles a la proteasa, sensibles a potencial redox ambiente, sensible al pH, escindibles al ácido, fotoescindible y/o sensibles al calor (véase por ejemplo Dosio F et al, *Toxins* 3: 848-83 (2011); Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-1369 (2013); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)).

Los enlazadores proteicos pueden ser elegidos para la incorporación en proteínas de fusión recombinantes de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos componentes de las proteínas de la presente invención o sus subcomponentes pueden estar unidos por uno o más enlazadores que comprenden uno o más aminoácidos, péptidos y/o polipéptidos. Para las proteínas de fusión recombinantes de la invención, los enlazadores comprenden típicamente de aproximadamente 2 a 50 residuos de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 residuos de aminoácidos (Argos P, *J Mol Biol* 211: 943-58 (1990); Williamson M, *Biochem J* 297: 240-60 (1994); George R, *Heringa J, Protein Eng* 15: 871-9 (2002); Kreitman R, *AAPS J* 8: E532-51 (2006)). Comúnmente, los enlazadores proteicos comprenden una mayoría de residuos de aminoácidos con residuos polares, no cargados, y/o cargados, tales como, por ejemplo, treoninas, prolina, glutaminas, glicinas y alaninas (véase, por ejemplo Huston J

et al. Proc Natl Acad Sci USA. 85: 5879-83 (1988); Pastan I et al, Annu Rev Med. 58: 221-37 (2007); Li J et al, Cell Immunol. 118: 85-99 (1989); Cumber A et al Bioconj Chem 3: 397-401 (1992); Friedman P et al, Cancer Res 53: 334-9 (1993); Whitlow M et al, Protein Engineering 6: 989-95 (1993); Siegall C et al, J Immunol 152: 2377-84 (1994); Newton et al Biochemistry 35: 545-53 (1996); Ladurner et al J Mol Biol 273: 330-7 (1997); Kreitman R et al, Leuk Lymphoma 52 : 82-6 (2011), US 4.894.443). Los ejemplos no limitantes de enlazadores proteicos incluyen alanina-serina-glicina-glicina-prolina-glutamato (ASGGPE) (SEQ ID NO: 89), valina-metionina (VM), alanina-metionina (AM), AM (G_{2a4S})_xAM (SEQ ID NO: 90) donde G es glicina, S es serina, y x es un número entero de 1 a 10.

Los enlazadores proteicos pueden ser seleccionados en base a las propiedades deseadas. Los enlazadores proteicos pueden ser elegidos por el experto en la materia con características específicas en mente, tales como para optimizar uno o más de las propiedades de plegamiento de la molécula de fusión, estabilidad, expresión, solubilidad, propiedades farmacocinéticas, propiedades farmacodinámicas, y/o la actividad de los dominios fusionados en el contexto de un constructo de fusión en comparación con la actividad del mismo dominio por sí mismo. Por ejemplo, los enlazadores proteináceos pueden seleccionarse basándose en la flexibilidad, la rigidez, y/o capacidad de escisión (véase, por ejemplo Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev. 65: 1357-1369 (2013)). El experto en la materia puede utilizar bases de datos y herramientas de software de diseño de enlazadores para elegir enlazadores. Ciertos enlazadores se pueden elegir para optimizar la expresión (véase, por ejemplo Turner D et al, J Immunol Methods 205: 43-54 (1997)). Ciertos enlazadores pueden elegirse para promover las interacciones intermoleculares entre polipéptidos o proteínas idénticas para formar homomultímeros o diferentes polipéptidos o proteínas para formar heteromultímeros. Por ejemplo, los enlazadores proteináceos pueden ser seleccionados que permitan interacciones no covalentes deseadas entre los componentes de polipéptidos de proteínas de la invención, tales como, por ejemplo, interacciones relacionadas con la formación de dímeros y otros multímeros de orden superior (ver por ejemplo, US 4.946.778).

Los enlazadores proteicos flexibles son a menudo mayores que 12 residuos de aminoácidos de largo y ricos en residuos de aminoácidos no polares pequeños, residuos de aminoácidos polares, y/o residuos de aminoácidos hidrófilos, tales como, por ejemplo, glicinas, serinas y treoninas (ver por ejemplo Bird R et al, Science 242: 423-6 (1988); Friedman P et al, Cancer Res. 53: 334-9 (1993); Siegall C et al, J Immunol 152: 2377-84 (1994)). Los enlazadores proteicos flexibles pueden ser elegidos para aumentar la separación espacial entre los componentes y/o para permitir interacciones intramoleculares entre los componentes. Por ejemplo, diversos enlazadores "GS" son conocidos por el experto y se componen de múltiples glicinas y/o una o más serinas, a veces en unidades de repetición, tales como, por ejemplo, (G_xS)_n (SEQ ID NO: 91), (S_xG)_n (SEQ ID NO: 92), (GGGG)_n (SEQ ID NO: 93), y (G)_n (SEQ ID NO: 94), en la que x es de 1 a 6 y n es de 1 a 30 (véase por ejemplo WO 96/06641). Los ejemplos no limitantes de enlazadores proteicos flexibles incluyen GKSSGSGSESKE (SEQ ID NO: 95), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 96), GSTSGSGKSSESGSGSTKG (SEQ ID NO: 97), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 99), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 100), SRSSG (SEQ ID NO: 101), y SGSSC (SEQ ID NO: 102).

Los enlazadores proteicos rígidos son a menudo estructuras rígidas alfa-helicoidales y ricas en residuos de prolina y/o uno o más prolinas colocadas estratégicamente (ver Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev. 65: 1357-1369 (2013)). Los enlazadores rígidos pueden ser elegidos para evitar interacciones intramoleculares entre los componentes.

Los enlazadores adecuados pueden ser elegidos para permitir la separación *in vivo* de los componentes, tales como, por ejemplo, debido a la escisión y/o inestabilidad específica del entorno (ver Dosio F et al, Toxins. 3: 848-83 (2011); Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* son capaces de desunirse mediante procesamiento proteolítico y/o de reducir entornos a menudo en un sitio específico dentro de un organismo o dentro de un cierto tipo de célula (véase, por ejemplo Doronina S et al, Bioconj Chem. 17: 144-24 (2006); Erickson H et al, Cancer Res 66: 4426-33 (2006)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* a menudo comprenden motivos sensible a la proteasa y/o enlaces disulfuro formados por un o más pares de cisteína (véase, por ejemplo Pietersz G et al, Cancer Res 48: 4469-76 (1998); El J et al, J Immunol. Procedimientos 110: 101-9 (1998); ver Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* pueden ser diseñados para ser sensibles a las proteasas que sólo existen en ciertos lugares en un organismo, compartimentos dentro de una célula y/o se vuelven activos sólo en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas (tales como, por ejemplo, proteasas con niveles anormalmente altos, proteasas sobreexpresadas en ciertos sitios de la enfermedad, y proteasas expresadas específicamente por un microorganismo patógeno). Por ejemplo, hay enlazadores proteicos conocidos en la técnica que son escindidos por proteasas presentes solamente intracelularmente, las proteasas presentes sólo dentro de determinados tipos de células, y las proteasas presentes sólo en condiciones patológicas, como el cáncer o la inflamación, tales como, por ejemplo, motivo R-x-x-R y AMGRSGGGCAGNRVGSSSLSCGGLNLQAM (SEQ ID NO: 103).

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, puede utilizarse un enlazador que comprende uno o más sitios sensible a proteasas para proporcionar la escisión por una proteasa presente dentro de una célula diana. En ciertas realizaciones de las proteínas de la invención, puede utilizarse un enlazador que no sea escindible para reducir la toxicidad no deseada después de la administración a un organismo vertebrado (véase, por ejemplo Polson A et al, Cancer Res. 69: 2358-64 (2009)).

Los enlazadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, enlazadores sensibles a la proteasa, sensibles a potencial redox ambiental, sensible al pH, escindible por ácido, fotoescindible, y/o sensibles al calor, ya sea proteínico o no proteínico (ver Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)).

Los enlazadores escindibles adecuados pueden incluir enlazadores que comprenden grupos escindibles que son conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, enlazadores señalados por Zarling D et al, J Immunol 124: 913-20 (1980); Jung S, Moroi M, Biochem Biophys Acta 761: 152-62 (1983); Bouizar Z et al, Eur J Biochem 155: 141-7 (1986); Parque L et al, J Biol Chem. 261: 205-10 (1986); Browning J, Ribolini A, J Immunol 143: 1859-1867 (1989); Joshi S, Burrows R, J Biol Chem 265: 14518-25 (1990).

Los enlazadores adecuados pueden incluir enlazadores sensibles al pH. Por ejemplo, ciertos enlazadores adecuados pueden ser elegidos por su inestabilidad en entornos de pH más bajos para proporcionar la disociación dentro de un compartimiento subcelular de una célula diana. Por ejemplo, enlazadores que comprenden uno o más grupos tritilo, grupos tritilo derivatizados, grupos bismaleimideotxi propano, grupos de dihidrazida de ácido adípico, y/o grupos de transferrina lábiles a ácido, pueden proporcionar la liberación de componentes de la invención, por ejemplo un componente polipéptido, en entornos con intervalos de pH específicos (véase, por ejemplo Welhöner H et al, J Biol Chem. 266: 4309-14 (1991); Fattom A et al, Infect Immun 60: 584-9 (1992)). Ciertos enlazadores se pueden elegir que escinden en intervalos de pH que corresponden a diferencias de pH fisiológico entre los tejidos, tales como, por ejemplo, el pH del tejido tumoral es menor que en los tejidos sanos (ver por ejemplo, US 5.612.474).

Los enlazadores fotoescindibles son enlazadores que se esciden después de la exposición a la radiación electromagnética de ciertos intervalos de longitud de onda, tales como luz en el rango visible (véase, por ejemplo Goldmacher V et al, Bioconj Chem. 3: 104-7 (1992)). Los enlazadores fotoescindibles se pueden usar para liberar un componente de una molécula de la invención, por ejemplo un componente de polipéptido, tras la exposición a la luz de determinadas longitudes de onda. Los ejemplos no limitantes de enlazadores fotoescindibles incluyen un grupo nitrobenzilo como grupo protector fotoescindible para cisteína, reticuladores de cloruro de nitrobenzilocarbonilo, copolímero de hidroxipropilmetacrilamida, copolímero de glicina, copolímero de fluoresceína y copolímero de metilrodamina (Hazum E et al., Pept Proc Eur Pept Symp. 16a, Brunfeldt K, ed, 105-110 (1981); Senter et al, Photochem Photobiol 42: 231-7 (1985); Yen et al, Makromol Chem. 190: 69-82 (1989); Goldmacher V et al, Bioconj Chem. 3: 104-7 (1992)). Los enlazadores fotoescindibles pueden tener usos particulares en la unión de componentes para formar moléculas de la invención diseñada para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones que pueden ser expuestas a la luz utilizando fibra óptica. En ciertas realizaciones de las proteínas de la invención, una región de unión dirigida a una célula se une a una región efectora de la toxina Shiga usando cualquier número de medios conocidos para el experto, incluyendo tanto enlaces covalentes como no covalentes (véase, por ejemplo Chen X et al., Drugs adv Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013); Behrens C, Liu B, MAbs 6: 46-53 (2014)).

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la proteína comprende una región de unión que es un scFv con un enlazador que conecta un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L). Hay numerosos enlazadores conocidos en la técnica adecuados para este propósito, tales como, por ejemplo, el péptido de 15 residuos (Gly4Ser)₃ (SEQ ID NO: 104). Enlazadores de scFv adecuados que pueden ser utilizados en la formación de estructuras multivalentes no covalentes incluyen GGS, GGGS (Gly3Ser o G3S) (SEQ ID NO: 105), GGGGS (Gly4Ser o G4S) (SEQ ID NO: 106), GGGSGGG (SEQ ID NO: 107), GGS GGGG (SEQ ID NO: 108), GSTSGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 109), y GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO: 110) (Plückthun A, Pack P, Immunotechnology 3: 83-105 (1997); Atwell J et al, Protein Eng. 12: 597-604 (1999); Wu A et al, Protein Eng 14: 1025-1033 (2001); Yazaki P et al, J Immunol Methods 253: 195-208 (2001); Carmichael J et al, J Mol Biol 326: 341-51 (2003); Arndt M et al, FEBS Lett 578: 257-61 (2004); Bie C et al, World J Hepatol 2: 185-91 (2010)).

Los procedimientos adecuados para la unión de los componentes de las proteínas de la presente invención pueden ser mediante cualquier procedimiento actualmente conocido en la técnica para llevarlas a cabo, siempre que la fijación no impida sustancialmente la capacidad de unión de la región de unión, la internalización celular de la proteína y/o función o funciones efectoras de la toxina deseada de la región efectora de la toxina Shiga tal como se mide mediante un ensayo apropiado, incluyendo los ensayos como se describe en el presente documento.

II. Ejemplos de variaciones estructurales específicas de las proteínas de la invención

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, las proteínas de la invención comprenden una región de unión derivada de un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado por la unión específica y de alta afinidad a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde se restringe el antígeno en la expresión a las células cancerosas (véase Glokler J et al, las moléculas 15: 2478-90 (2010); Liu Y et al, Lab chip 9: 1033-6 (2009)). De acuerdo con otras formas de realización, se selecciona la región de unión para una unión específica y de alta afinidad a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde el antígeno es sobreexpresado o preferencialmente expresado por las células cancerosas en comparación con células no cancerosas. Algunas biomoléculas diana representativas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes dianas enumeradas asociadas con cánceres y/o tipos de células inmunes específicos.

Existen muchas regiones de unión de tipo inmunoglobulina que reconocen epítomos asociados con células cancerosas en la técnica anterior, tales como las regiones de unión que reconocen (los nombres alternativos se indican entre paréntesis) anexina A1, antígeno de melanoma B3, antígeno de melanoma B4, CD2, CD3, CD4, CD20 (proteína de antígeno de linfocitos B CD20), CD22, CD25 (receptor de interleuquina-2 IL2R), CD30 (TNFRSF8), CD38 (ADP ribosa cíclica hidrolasa), CD40, CD44 (receptor de hialuronano), ITGAV (CD51), CD66, CD71 (receptor de transferrina), CD73, CD74 (cadena invariante asociada a antígenos de HLA-DR), CD79, CD98, endoglina (FIN o CD105), CD106 (VCAM-1), receptor de quimioquinas tipo 4 (CD133), CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140, CD146, CD147, CD148, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158, CD159, CD160, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172, CD173, CD174, CD175, CD176, CD177, CD178, CD179, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD187, CD188, CD189, CD190, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CD199, CD200, receptor de factor de crecimiento 1 semejante a insulina (CD221), mucina 1 (MUC1, CD227), molécula de adhesión de células basales (B-CAM o CD239), CD248 (endosialina o TEM1), receptor del factor necrosis tumoral 10b (TNFRSF10B, CD262), receptor del factor de necrosis tumoral 13B (TNFRSF13B, TACI, CD276), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (KDR, CD309), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM, CD326), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/Neu/ErbB2/CD340), antígeno de cáncer 15-3 (CA15-3), antígeno de cáncer 19-9 (CA 19-9), antígeno de cáncer 125 (CA125, MUC16), CA242, moléculas de adhesión celular relacionadas con antígeno carcinoembrionario (por ejemplo CEACAM3 (CD66d) y CEACAM5), proteína de antígeno carcinoembrionario (CEA), proteoglicanos de sulfato de condroitina 4 (CSP4, MCSP, NG2), CTLA4, DLL4, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB1), receptor de folato (FOLR), G-28, gangliósido GD2, gangliósido GD3, HLA-DR10, HLA-DRB, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1 (HER1), receptor 2 de Efrina tipo-B (EphB2), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), proteína de activación de fibroblastos (FAP/seprasa), receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), receptor de interleuquina 2 (IL-2R), receptor de interleuquina 6 (IL-6R), integrinas alfa-V beta-3 ($\alpha_v\beta_3$), integrinas alfa-V beta-5, integrinas alfa-5 beta-1 ($\alpha_5\beta_1$), L6, MPG, proteína de antígeno asociado a melanoma 1 (MAGE 1), antígeno asociado a melanoma 3 (MAGE-3), mesotelina (MSLN), MPG, MS4A, p21, p97, receptor de virus de la polio similar 4 (PVRL4), receptores activados por proteasa (tales como PAR1), proteína de antígeno de membrana específica de la próstata (PSMA), glicoproteína de trofoblasto (TPGB) y transductores de señal de calcio asociados a tumores (TACSTDs) (véase, por ejemplo Lui B et al, Cancer Res. 64: 704-10 (2004); Novellino L et al, Cancer Immunol Immunother 54: 187-207 (2005); Bagley R et al, Int J Oncol 34: 619-27 (2009); Gerber H et al, mAbs 1: 247-53 (2009); Beck A et al, Nat Rev Immunol. 10: 345-52 (2010); Andersen J et al, J Biol Chem 287: 22927-37 (2012); Nolan-Stevaux O et al, PLoS One 7: e50920 (2012); Rust S et al, Cancer Mol 12: 11 (2013)). Esta lista de biomoléculas diana no pretende ser limitativa. Se apreciará por el experto en la materia que cualquier biomolécula diana deseada asociada con una célula de cáncer u otro tipo de célula deseada se puede usar para diseñar o seleccionar una región de unión para acoplarse con la región efectora de la toxina Shiga para producir una proteína de la invención.

Ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con las células cancerosas y regiones de unión de tipo inmunoglobulina conocidas por unirse a las mismas incluyen proteínas BAGE (antígenos de melanoma B), moléculas de adhesión celular basal (BCAMs o glicoproteínas de grupos sanguíneos luteranos), antígeno de tumor de vejiga (BTA), antígeno de cáncer de testículo NY-ESO-1, proteínas LAGE de antígeno de cáncer de testículo, CD19 (proteína de antígeno de linfocitos B CD19), CD21 (receptor del complemento-2 o receptor del complemento 3d), CD26 (dipeptidil peptidasa-4, DPP4, o proteína complejante de adenosina desaminasa 2), CD33 (lectina de tipo inmunoglobulina 3 de unión a ácido siálico), CD52 (antígeno de CAMPATH-1), CD56 (molécula de adhesión celular neural o NCAM), CD133 (prominina-1), CS1 (familia SLAM número 7 o SLAMF7), proteína de antígeno de la superficie celular A33 (gpA33), proteínas de antígeno de virus Epstein-Barr, proteínas GAGE/PAGE (antígenos de cáncer/testículo asociado a melanoma), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR o c-Met), proteínas MAGE, antígeno de melanoma reconocido por proteína 1 de células T (MART-1/MelanA, MARTI), mucinas, expresados proteínas de antígeno preferencialmente expresadas de melanoma (PRAME), proteína de antígeno específica de próstata (PSA), proteína de antígeno de células madre de próstata (PSCA), receptor para productos finales de glucosilación avanzada (RAGE), glicoproteína asociada a tumor 72 (TAG -72), receptor transmembrana de proteína tirosina quinasa (ROR1 o NTRK1), receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFRs) y el antígeno de tumor de Wilms.

Ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con las células cancerosas son anhidrasa carbónica IX (CA9/CAIX), proteínas claudin (CLDN3, CLDN4), receptor 3 de efrina tipo-A (EphA3), proteínas de unión a folato (FBP), gangliósido GM2, receptores de factores de crecimiento similares a la insulina, integrinas (como CD11a-c), receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK), receptor de proteína tirosina quinasa erb-3, receptor del factor necrosis tumoral 10A (TRAIL-R1/DR4), receptor del factor de necrosis tumoral 10B (TRAIL-R2), tenascina C, y CD64 (FcγRI) (véase Hough C et al, Cancer Res 60: 6281-7 (2000); Thepen T et al, Nat Biotechnol 18: 48-51 (2000); Pastan I et al, Cancer Nat Rev 6: 559-65 (2006); Pastan, Annu Rev Med 58: 221-37 (2007); Fitzgerald D et al, Cancer Res 71: 6300-9 (2011); Scott A et al, Cancer Immun 12: 14-22 (2012)). Esta lista de biomoléculas diana no pretende ser limitativa.

Además, existen numerosos otros ejemplos de biomoléculas diana contempladas, tales como las metaloproteinasas de ADAM (por ejemplo, ADAM-9, ADAM-10, ADAM-12, ADAM-15, ADAM-17), ADP-ribosiltransferasas (ART1, ART4), antígeno F4/80, antígenos de estroma de médula ósea (BST1, BST2), proteínas del oncogén c-abl de la región clúster de punto de ruptura (BCR-aBL), C3aR (receptores del componente de complemento 3a), CD7, CD13, CD14, CD15 (antígeno embrionario Lewis X o específico de etapa 1), CD23 (FC epsilon RII), CD49d, CD53, CD54 (molécula de adhesión intercelular 1), CD63 (tetraspanina), CD69, CD80, CD86, CD88 (receptor 1 de componente de complemento componente 5a), CD115 (receptor del factor estimulante de colonias 1), CD123 (receptor de

interleuquina-3), CD129 (receptor de interleuquina 9), CD183 (receptor de quimioquinas CXCR3), CD191 (CCR1), CD193 (CCR3), CD195 (receptor de quimioquina CCR5), CD203c, CD225 (proteína transmembrana inducida por interferón 1), CD244 (receptor de células asesinas naturales 2B4), CD282 (receptor de tipo Toll 2), CD284 (receptor de tipo Toll 4), CD294 (GPR44), CD305 (receptor de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos 1), receptor 2 de efrina tipo-A (EphA2), FcεR1a, galectina-9, proteína de antígeno alfa-fetoproteína 17-A1, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana (HAAH), transcripción similar a inmunoglobulina ILT-3, lisofosfatidilglicerol aciltransferasa 1 (LPGAT1/IAA0205), proteínas de membrana asociada a lisosoma (LAMP, tales como CD107), proteínas de melanocitos PMEL (gp100), proteína-14 relacionada con mieloides (MRP-14), ligando 1 de muerte programada (PD-L1), receptor de proteína tirosina quinasa erbB-3, proteínas SART, receptores scavenger (tales como CD64 y CD68), Siglecs (lectinas de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico), sindecanos (tales como SDC1 o CD138), tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TRP-1), proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP-2), antígeno asociado a tirosinasa (TAA), APO-3, BCMA, CD2, CD3, CD4, CD8, CD18, CD27, CD28, CD29, CD41, CD49, CD90, CD95 (Fas), CD103, CD104, CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA-4), receptores de quimioquinas, proteínas del complemento, receptores de citocinas, proteínas de histocompatibilidad, ICOS, interferón-alfa, interferón-beta, c-myc, osteoprotegerina, PD-1, RANK, TACI, miembro de la superfamilia de receptores de TNF (TNF-R1, TNFR-2), Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, y TRAIL-R4 (ver, Cheever M et al, Clin Cancer Res. 15: 5323-37 (2009); Scott A et al, Cancer Immun 12: 14 (2012)), para biomoléculas diana y cabe indicar que las moléculas diana descritas en la misma son ejemplos no limitantes). Se apreciará por el experto en la materia que cualquier biomolécula diana deseada se puede usar para diseñar o seleccionar una región de unión para ser acoplada con la región efectora de toxina Shiga para producir una proteína de la invención.

En ciertas realizaciones, la región de unión comprende o consiste esencialmente en un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a la superficie celular de un tipo de célula del sistema inmunitario. Por ejemplo, los dominios de unión de tipo inmunoglobulina son conocidos por unirse a CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11, CD12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD40, CD41, CD56, CD61, CD62, CD66, CD95, CD117, CD123, CD235, CD146, CD326, receptor de interleuquina 2 (IL-2R), receptor activador del ligando kappa B de factor nuclear (RANKL, TNFSF11, TRANCE, OPGL, ODF), proteína asociada a SLAM (SAP), y TNFSF18 (ligando 18 del factor de necrosis tumoral o GITRL).

En ciertas realizaciones, la región de unión se une con alta afinidad a la biomolécula diana que es un receptor de quimioquinas seleccionado de los siguientes CXCR-1, CXCR-2, CXCR-3 A, CXCR3B, CXCR-4, CXCR-5, CCR-1, CCR-2A, CCR-2B, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9, CCR-10, CX3CR-1, XCR1, CXCR-6, CXCR-7, la proteína-2 de unión a quimioquinas (CCBP2, receptor D6), y el receptor de antígeno/quimioquinas Duffy (DARC glicoproteína, Fy, FY, CD234). Para más biomoléculas diana no limitantes, véase la Tabla 11 en los Ejemplos siguientes.

En ciertas realizaciones, la región de unión comprende o consiste esencialmente en un ligando seleccionado para reconocer un receptor extracelular. Algunos ligandos representativos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: proteínas morfogenéticas óseas e inhibidor unido a la membrana de activina BAMBI (también conocido como TGFBR), quimioquinas, quimioquina 1 atrayente de células B (BCA-1), quimioquina expresada en mama y riñón (BRAK), CIO, ligando de motivo C-C de quimioquinas 2 (CCL2), CD137L (también conocido como 41BB), quimioquina de tracción de células T cutáneas (CTACK), receptor señuelo 3 DcR3 (también conocido como TR6 y TNFRSF6B), proteína activadora de neutrófilos derivada de epiteliales 78 (ENA-78), proteínas quimiotácticas de eosinófilos (por ejemplo, eotaxina-1, eotaxina-2, y eotaxina-3), éxodo-2 (SLC), fractalquina, proteína quimiotáctica de granulocitos 2 (GCP-2), proteína regulada del crecimiento α (GRO-α), quimioquina CC de hemofiltrado 1 (HCC-1), interleuquina-8 (IL-8), proteína inducible por interferón 10 (IP-10), quimioatrayente de células T alfa inducible por interferón (I-TAC), quimioquina expresada en hígado (LEC), lungquina, linfotactina, quimioquina derivada de macrófagos (MDC), quimioquina epitelial asociada a mucosas (MEC), monoquina inducida por interferón gamma (MIG), proteínas inhibitoras de macrófagos (por ejemplo MIP-1α, MIP-1β, MIP-1γ, MIP-2, MIP-2α, MIP-2β, MIP-3, MIP-3β, MIP-3α, MIP-4, y MIP-5), proteínas quimiotácticas de monocitos (por ejemplo, MCP-1 o MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, y MCP-5), proteína básica de plaquetas (PBP), factor plaquetario 4 (PF-4), proteína snormales reguladas en la activación, expresadas y secretadas por células T (RANTES), factores derivados del estroma (por ejemplo, SDF-1 y SDF-2), motivo C único 1β (SCM-1β), quimioquina de timo y regulada por activación (TARC), quimioquina expresada en el timo (TECK), factor de necrosis tumoral TWEAK (también conocido como TNFSF12 y APO3L), y variantes alélicas o de especies de los mismos. Para más ligandos de ejemplo no limitativos, consulte la Tabla 11 en los Ejemplos siguientes.

Entre ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región efectora de la toxina Shiga que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3). Otras formas de realización son proteínas en las que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 241 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3). Otras formas de realización son proteínas en las que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3). Otras formas de realización son proteínas en las que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 261 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA

(SEQ ID NO: 2), y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3).

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 2-245 de la SEQ ID NO: 4, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a HER2 humano. Otras formas de realización son las proteínas que comprenden uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 4-7.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 2-241 de la SEQ ID NO: 8, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a CD38 humano. Otras formas de realización son las proteínas que comprenden uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 8-11.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 2-250 de la SEQ ID NO: 12, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a CD19 humano. Otras formas de realización son las proteínas que comprenden uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 12-15.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 2-251 de la SEQ ID NO: 16, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a CD74 humano. Otras formas de realización son las proteínas que comprenden uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 16-19.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, la región de unión es una región derivada de inmunoglobulina de un solo dominio V_{HH} que muestra una unión de alta afinidad específicamente a HER2, tal como derivada de una región variable de un solo dominio de la proteína 5F7 del anticuerpo camélido (V_{HH}), tal como se describe en la Solicitud de patente de EE.UU. 2011/0059090. En ciertas realizaciones adicionales, las proteínas de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 2-119 de la SEQ ID NO: 20, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a HER2 humano. Otras formas de realización son las proteínas que comprenden uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 20-27.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región de unión que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 2-99 de la SEQ ID NO: 28, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a CD20 humano. Otras formas de realización son las proteínas que comprenden uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 28-29.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región de unión que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 2-134 de la SEQ ID NO: 30, muestra una unión de alta afinidad específicamente a receptor de interleuquina-2 humana (IL-2R). Otras formas de realización son las proteínas que comprenden uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 30-33.

Tal como se utiliza aquí, el término "dominio variable de cadena pesada (V_H)" o "dominio variable de cadena ligera (V_L)" se refieren respectivamente a cualquier dominio de anticuerpo V_H o V_L (por ejemplo, un dominio V_H o V_L humano), así como cualquier derivado de los mismos que retiene por lo menos la capacidad de unión a antígeno cualitativa del anticuerpo nativo correspondiente (por ejemplo un dominio V_H o V_L humanizado derivado de un dominio V_H o V_L murino nativo). Un dominio V_H o V_L consiste en una región "marco" interrumpida por las tres CDRs o ABRs. Las regiones marco sirven para alinear las CDR para la unión a un epítipo de un antígeno específico. Desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo terminal, ambos dominios V_H y V_L comprenden las siguientes regiones marco (FR) y regiones CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Para fragmentos V_{HH} de camélido, IgNARs de peces cartilaginosos, fragmentos V_{NAR} y derivados de los mismos, existe un solo dominio variable de cadena pesada que comprende la misma disposición básica: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

La presente descripción proporciona fragmentos, variantes, y/o derivados de los polipéptidos de las proteínas descritas en este documento que contienen un sitio de unión a biomolécula diana extracelular funcional, e incluso más preferiblemente capaz de unirse a la biomolécula diana con alta afinidad (por ejemplo, como se muestra por K_D). Por ejemplo, aunque la invención proporciona secuencias de polipéptidos que pueden unirse específicamente a CD19, CD20, CD38, CD74, y HER2, cualquier región de unión que se une a una biomolécula diana extracelular acoplada físicamente a una célula, expresada en una superficie celular, con una constante de disociación de 10^{-5} a 10^{-12} moles por litro, preferiblemente menos de 200 nM, puede estar sustituida para su uso en la fabricación de proteínas de la invención y los procedimientos descritos en el presente documento.

Entre ciertas realizaciones de la proteína de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de una nanoanticuerpo o región derivada de inmunoglobulina de dominio único V_{HH} . Generalmente, los nanoanticuerpos se construyen a partir de fragmentos de anticuerpos de dominio variable monoméricos únicos de origen natural (sdAbs) del tipo que se encuentran en los camélidos y peces cartilaginosos (Chondrichthyes). Los

nanoanticuerpos se diseñan a partir de estos anticuerpos de origen natural truncando el dominio variable monomérico único para crear una molécula más pequeña y más estable, tal como, por ejemplo las construcciones IgNAR, V_HH y V_{NAR}. Debido a su pequeño tamaño, los nanoanticuerpos son capaces de unirse a los antígenos que no son accesibles a los anticuerpos enteros. Entre ciertas realizaciones de la proteína de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de un nanoanticuerpo o región derivada de inmunoglobulina de dominio único V_HH que muestra una unión de alta afinidad específicamente a proteínas HER2 humanas.

III. Funciones generales de las proteínas de la invención

La presente invención proporciona una proteína, que comprende 1) una región de unión para el reconocimiento celular como se define en las reivindicaciones; 2) una región efectora de la subunidad A de la toxina Shiga como se define en las reivindicaciones; y 3) un motivo señal retención/recuperación carboxi-terminal de retículo endoplásmico de un miembro de la familia KDEL como se define en las reivindicaciones; en la que la proteína está unida a un material exógeno adicional, tal como se define en las reivindicaciones. La unión de las regiones de unión de reconocimiento celular con las regiones derivadas de la subunidad A de toxinas Shiga permite el diseño de un reconocimiento específico de células de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones, las proteínas de la invención son capaces de unirse a biomoléculas diana extracelulares asociadas a la superficie celular de tipos de células particulares y entran en esas células. Una vez interiorizadas dentro de un tipo de célula específica, ciertas realizaciones de las proteínas de la invención son capaces de dirigir un fragmento de polipéptido efector de la toxina Shiga citotóxico en el citosol de la célula diana. Una vez en el citosol de un tipo de célula específica, ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la invención son capaces de inactivar los ribosomas enzimáticamente, interfiriendo con la homeostasis celular, y finalmente eliminar la célula. Este sistema es modular, en que cualquier número de diversas regiones de unión se puede utilizar para dirigir esta potente citotoxicidad o citostasis a varios tipos de células diversas. La proteína de la invención se usa para suministrar un material exógeno adicional en las células diana, tales como agentes promotores de detección para marcar los interiores de las células diana para las funciones de recogida de información de diagnóstico.

A. Eliminación celular a través de la citotoxicidad de la toxina Shiga dirigida

Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para eliminar las células eucariotas, las proteínas diseñadas usando regiones efectoras de toxina Shiga pueden mostrar una potente actividad de eliminación de células. Las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga comprenden dominios enzimáticos capaces de eliminar una célula eucariota una vez en el citosol de la célula. Ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la invención se aprovechan de este mecanismo citotóxico pero deben ser capaces de llevar la región efectora de la toxina Shiga al citosol de un tipo de célula diana. La adición de un motivo señal de tipo KDEL mejora la citotoxicidad de las proteínas citotóxicas de la invención muy probablemente proporcionando un suficiente enrutamiento intracelular para promover la liberación de un polipéptido efector de la toxina Shiga al citosol.

En ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la presente invención, al entrar en contacto una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de una proteína citotóxica de la invención, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte de la célula. La muerte de células se puede realizar usando una proteína citotóxica de la invención bajo condiciones variadas de las células diana, tales como una célula diana manipulada *ex vivo*, una célula diana cultivada *in vitro*, una célula diana dentro de una muestra de tejido cultivada *in vitro* o una célula diana *in vivo*.

La expresión de la biomolécula diana no tiene que ser nativa con el fin de eliminar células diana por una proteína citotóxica de la invención. La expresión en la superficie celular de la biomolécula diana podría ser el resultado de una infección, la presencia de un patógeno, y/o la presencia de un patógeno microbiano intracelular. La expresión de una biomolécula diana podría ser artificial tal como, por ejemplo, por expresión forzada o inducida después de la infección con un vector de expresión viral, véase, por ejemplo, sistemas adenovirales, adeno-asociados y los sistemas retrovirales. Un ejemplo de la inducción de la expresión de una biomolécula diana es la regulación positiva de la expresión de CD38 de las células expuestas a los retinoides, como el ácido todo-trans retinoico y diversos retinoides sintéticos, o cualquier agonista del receptor de ácido retinoico (RAR) (Drach J et al., Cancer Res 54: 1746-1752 (1994); Urano A et al, J Leukoc Biol. 90: 235-47 (2011)). En otro ejemplo, la expresión de CD20, HER2 y EGFR pueden ser inducida mediante la exposición de una célula a la radiación ionizante (Wattenberg M et al, Br J Cancer. 110: 1472-1480 (2014)).

B. Citotoxicidad selectiva entre tipos de células

Al dirigirse la liberación de las regiones de la toxina Shiga enzimáticamente activas utilizando regiones de unión de alta afinidad a tipos de células específicas, esta potente actividad de eliminación celular puede restringirse a eliminar preferentemente tipos de células seleccionadas. La presente invención proporciona varias proteínas citotóxicas con esta capacidad funcional.

En ciertas realizaciones, la administración de la proteína citotóxica de la presente invención a una mezcla de tipos de células, la proteína citotóxica es capaz de eliminar selectivamente las células que se acoplan físicamente con un

cierto biomolécula diana extracelular en comparación con los tipos de células no acopladas físicamente con cualquier biomolécula diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína citotóxica. Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para eliminar las células eucariotas, las proteínas citotóxicas diseñadas utilizando regiones efectoras de la toxina Shiga pueden mostrar una actividad citotóxica potente. Al dirigir la liberación de regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas a tipos de células específicas utilizando regiones de unión de alta afinidad, esta actividad de muerte celular potente puede restringirse a eliminar preferentemente sólo aquellos tipos de células deseadas reconocidas por su asociación física con una biomolécula diana específicamente unida por regiones de unión elegidas.

En ciertas realizaciones, la proteína citotóxica de la presente invención es capaz de causar selectivamente o preferencialmente la muerte de un tipo celular específico dentro de una mezcla de dos o más tipos de células diferentes. Esto permite que el enrutamiento de la actividad citotóxica a los tipos de células específicas con una alta preferencialidad, tales como un efecto citotóxico de 3 veces sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan la biomolécula diana. Alternativamente, la expresión de la biomolécula diana de la región de unión puede ser no exclusiva para un tipo de célula si la biomolécula diana se expresa en suficientes cantidades bajas y/o se acopla físicamente en cantidades bajas con tipos de células que no son reconocidas. Esto permite la eliminación celular selectiva de tipos de células específicas con una alta preferencialidad, tales como un efecto citotóxico de 3 veces sobre tipos de células "espectadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana o no se acoplan físicamente a cantidades significativas de la biomolécula diana.

Los niveles de biomoléculas diana extracelular sobre la superficie de las células se pueden determinar usando diversos procedimientos conocidos para el experto, tales como, por ejemplo, los procedimientos de FACS. Como se usa en el presente documento, una cantidad significativa de una biomolécula diana extracelular expresada en una superficie celular es mayor que 10000, 20000, 30000, 40000, 50000, 60000 o 70000 de la intensidad de fluorescencia media (MFI) por análisis FACS en función del tipo de célula.

En ciertas realizaciones adicionales, la administración de la proteína citotóxica de la invención a dos poblaciones de tipos de células que se diferencian con respecto a la presencia y/o secuencia de polipéptido de una biomolécula diana extracelular, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte celular tal como se define por la concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) en una población de células diana, cuyos miembros expresan una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína citotóxica, por ejemplo, a una dosis por lo menos tres veces menor que la dosis CD₅₀ de la misma proteína citotóxica a una población de células cuyos miembros no expresan una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína citotóxica.

En ciertas realizaciones, la actividad citotóxica de una proteína de la presente invención hacia poblaciones de tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular es al menos 3 veces mayor que la actividad citotóxica hacia las poblaciones de tipos de células no acopladas físicamente con cualquier biomolécula diana extracelular unida específicamente por la proteína de la invención. La citotoxicidad selectiva puede ser cuantificada en términos de la relación (a/b) de (a) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo celular específico acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión a (b) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo celular no acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión. En ciertas realizaciones, la relación de citotoxicidad es indicativa de la citotoxicidad selectiva que es al menos 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces, 750 veces, 1000 veces, o más alta para las poblaciones de células o tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión en comparación con poblaciones de células o tipos de células no acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión.

Esta función de eliminación celular preferencial permite eliminar una célula diana por ciertas proteínas citotóxicas de la invención bajo condiciones variadas y en presencia de células espectadoras no reconocidas, tales como mezclas manipuladas *ex vivo* de tipos de células, tejidos cultivados *in vitro* con mezclas de tipos de células, o *in vivo* en presencia de múltiples tipos de células (por ejemplo, *in situ* o en una ubicación nativa dentro de un organismo multicelular).

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención son capaces de causar selectivamente o preferencialmente la muerte de un tipo celular específico dentro de una mezcla de dos o más tipos de células diferentes. Esto permite la actividad citotóxica dirigida a determinados tipos de células con una alta preferencialidad, tal como un efecto citotóxico de 3 veces sobre tipos de células "espectadoras" que no expresan la diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína citotóxica de la invención. Alternativamente, la expresión de una biomolécula diana extracelular puede ser no exclusiva para un tipo de célula si la biomolécula diana extracelular se expresa en suficientes cantidades bajas por tipos de células que no son reconocidas. Esto permite la eliminación celular preferencial de sólo aquel o aquellos tipos celulares que expresan las cantidades más altas de biomoléculas diana extracelulares, tales como un efecto citotóxico de 3 veces sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana unida específicamente por la proteína citotóxica y/o no están acopladas físicamente a cantidades significativas de biomolécula diana expuesta extracelularmente específicamente unida por la proteína citotóxica.

Las proteínas citotóxicas de la presente invención son útiles para la eliminación de poblaciones de tipos de células específicos. Por ejemplo, las proteínas citotóxicas de la invención son útiles para el tratamiento de ciertos tumores, cánceres, y/u otras anormalidades de crecimiento mediante la eliminación de células + de "biomolécula diana" que expresan niveles elevados de biomolécula diana en una o más superficies celulares.

En ciertas realizaciones, la actividad citotóxica de una proteína de la presente invención hacia poblaciones de tipos de células acopladas físicamente con una cierta biomolécula diana extracelular es al menos 3 veces mayor que la actividad citotóxica hacia las poblaciones de tipos de células no acopladas físicamente con cantidades significativas de una biomolécula diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína particular de la invención. Según la presente invención, la citotoxicidad selectiva puede ser cuantificada en términos de la relación (a/b) de (a) citotoxicidad hacia una población de células acopladas físicamente con una cantidad significativa de una biomolécula diana extracelular unida por la región de unión de la proteína citotóxica de la invención a (b) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo celular no acopladas físicamente con una cantidad significativa de cualquier biomolécula diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína citotóxica particular de la invención. En ciertas realizaciones, la relación de citotoxicidad es indicativa de la citotoxicidad selectiva que es al menos 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces, 750 veces, 1000 veces o mayor para las poblaciones de células o tipos de células que expresan una biomolécula diana extracelular o están acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular unida por la región de la proteína citotóxica de la invención en comparación con poblaciones de células o tipos de células que no expresan una biomolécula diana extracelular o que no se acoplan físicamente con cantidades significativas de una biomolécula diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína citotóxica en particular de la invención. Por ejemplo, tras la administración de ciertas proteínas citotóxicas de la presente invención a dos poblaciones diferentes de células que se diferencian con respecto a la presencia y/o secuencia de polipéptido de una biomolécula diana extracelular, la proteína citotóxica de la invención es capaz de causar la muerte celular de los tipos de células acoplados físicamente con una biomolécula diana extracelular unida por la región de unión de la proteína citotóxica, por ejemplo, en una CD_{50} que es al menos tres veces menor que la CD_{50} observada para tipos de células que no se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular unida por la región de unión de la proteína citotóxica o para tipos de células que se acoplan físicamente únicamente con formas de esa biomolécula diana extracelular que comprenden variaciones de secuencias o mutaciones que alteran la especificidad de unión por la región de unión de esa proteína citotóxica.

En ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la presente invención, la administración de la proteína citotóxica a dos poblaciones diferentes de tipos de células, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte celular tal como se define por la concentración citotóxica semimáxima (CD_{50}) en una primera población de células, cuyos miembros expresan una cierta biomolécula diana en una superficie celular, a una dosis por lo menos tres veces menor que la dosis CD_{50} de la misma proteína citotóxica a una segunda población de células cuyos miembros no expresan esa biomolécula diana, no expresan una cantidad significativa de esa biomolécula diana, o no exponen una cantidad significativa de esa biomolécula diana unida por la región de unión de la proteína citotóxica.

C. Liberación de material exógeno adicional en el interior de una célula diana

La presente invención proporciona una proteína, tal como se define en las reivindicaciones, que está unida a un material exógeno adicional para liberar a los interiores de las células diana, tal como se define en las reivindicaciones. La liberación de materiales exógenos adicionales se puede utilizar, por ejemplo, para funciones citotóxicas, citoestáticas, recopilación de información y/o funciones de diagnóstico. Las variantes no tóxicas de las proteínas citotóxicas de la invención, o variantes opcionalmente tóxicas, pueden ser usadas para la liberación de materiales exógenos adicionales y/o para marcar los interiores de las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la proteína citotóxica. Varios tipos de células y/o poblaciones de células que expresan biomoléculas diana a al menos una superficie celular pueden ser reconocidas por las proteínas de la invención para la recepción de materiales exógenos. Los componentes funcionales de la proteína de la presente invención son modulares en que las diversas regiones efectoras de la toxina Shiga y los materiales exógenos adicionales pueden estar unidos a diferentes regiones de unión para proporcionar diversas aplicaciones, tales como obtención no invasiva de imágenes *in vivo* de las células tumorales.

Debido a que las proteínas de la presente invención, ya sean tóxicas o no tóxicas, y formas catalíticamente inactivas de las mismas, son capaces de entrar en las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular reconocida por su región de unión, la proteína de la invención se usa para la liberación de materiales exógenos adicionales en el interior de tipos de células específicas. En un sentido, la proteína entera es un material exógeno que entrará en la célula; por lo tanto, los materiales exógenos "adicionales" son materiales heterólogos unidos pero distintos de la propia proteína del núcleo.

"Material exógeno adicional" tal como se utiliza aquí se refiere a una o más moléculas, a menudo no presentes generalmente dentro de una célula diana nativa, donde las proteínas de la presente invención pueden utilizarse para transportar específicamente dicho material al interior de una célula. Los ejemplos no limitativos de materiales exógenos adicionales son agentes citotóxicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, polinucleótidos, agentes promotores de detección y agentes quimioterapéuticos de molécula pequeña.

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención para la liberación de material exógeno adicional, el material exógeno adicional es un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de molécula pequeña, antibiótico citotóxico, agente alquilante, antimetabolito, inhibidor de la topoisomerasa y/o inhibidor de tubulina. Los ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos incluyen aziridinas, cisplatinos, tetrazinas, procarbazona, hexametilmelamina, alcaloides de vinca, taxanos, camptotecinas, etopósido, doxorubicina, mitoxantrona, tenipósido, novobiocina, aclarrubicina, antraciclinas, actinomicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, daunorubicina, epirubicina, idarrubicina, dolastatinas, maitansinas, docetaxel, adriamicina, caliqueamicina, auristatinas, pirrolobenzodiazepina, carboplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, mitomicina C, paclitaxel, 1,3-Bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), rifampicina, cisplatino, metotrexato y gemcitabina.

En ciertas realizaciones, el material exógeno adicional comprende una proteína o polipéptido que comprende una enzima. En ciertas otras realizaciones, el material exógeno adicional es un ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un ácido ribonucleico que funciona como un ARN inhibidor pequeño (siRNA) o microRNA (miRNA). En ciertas realizaciones, el material exógeno adicional es un antígeno, tal como antígenos derivados de proteínas bacterianas, proteínas virales, proteínas mutadas en el cáncer, proteínas aberrantemente expresadas en el cáncer, o regiones determinantes complementarias de células T. Por ejemplo, los materiales exógenos incluyen antígenos, tales como los característicos de las células presentadoras de antígeno infectadas por bacterias y regiones determinantes complementarias de células T capaces de funcionar como antígenos exógenos.

D. Recopilación de información para funciones de diagnóstico

Ciertas proteínas de la invención tienen usos en la detección *in vitro* y/o *in vivo* de células específicas, tipos de células, y/o poblaciones de células. En ciertas realizaciones, las proteínas citotóxicas descritas en este documento se utilizan tanto para el diagnóstico como el tratamiento, o para el diagnóstico solo. Cuando se usa la misma proteína citotóxica tanto para el diagnóstico como el tratamiento, la variante de proteína citotóxica que incorpora una agente promotor de detección para el diagnóstico puede volverse no tóxica por la inactivación catalítica de una región efectora de toxina Shiga a través de una o más sustituciones de aminoácidos, incluyendo sustituciones de ejemplo descritas en este documento. Las formas catalíticamente inactivas de las proteínas citotóxicas de la invención que se conjugan a agentes promotores de la detección opcionalmente pueden usarse para funciones de diagnóstico, tales como para el diagnóstico de compañía utilizada en conjunción con un régimen terapéutico que comprende la misma o una región de unión relacionada.

La capacidad para conjugar agentes promotores de la detección conocidos en la técnica a diversas proteínas de la invención proporciona composiciones útiles para la detección de células de cáncer, tumores, inmunes y células infectadas. Estas formas de realización de diagnóstico de las proteínas de la presente invención pueden ser utilizadas para la recopilación de información a través de diversas técnicas de imagen y ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las realizaciones de diagnóstico de las proteínas de la invención pueden ser utilizadas para la recopilación de información a través de imágenes de los orgánulos intracelulares (por ejemplo compartimentos endocitóticos, de Golgi, retículo endoplásmico y citosólicos) de células individuales de cáncer, inmunes, o células infectadas en un paciente o muestra de biopsia.

Pueden recogerse varios tipos de información utilizando las realizaciones de diagnóstico de las proteínas de la invención ya sea para usos de diagnóstico u otros usos. Esta información puede ser útil, por ejemplo, en el diagnóstico de los tipos de células neoplásicas, la determinación de susceptibilidades terapéuticas de la enfermedad de un paciente, el ensayo de la progresión de terapias antineoplásicas con el tiempo, el ensayo de la progresión de las terapias inmunomoduladoras con el tiempo, el ensayo de la progresión de las terapias antimicrobianas con el tiempo, evaluar la presencia de células infectadas en los materiales de trasplante, evaluar la presencia de tipos celulares no deseados en los materiales de trasplante, y/o evaluar la presencia de células tumorales residuales después de la extirpación quirúrgica de una masa tumoral.

Por ejemplo, podrían determinarse subpoblaciones de pacientes utilizando información obtenida usando las variantes de diagnóstico de las proteínas de la presente invención y, a continuación, los pacientes individuales pueden ser categorizados en subpoblaciones en función de su característica o características únicas reveladas usando aquellas formas de realización de diagnóstico. Por ejemplo, la eficacia de productos farmacéuticos o terapias específicas podría ser un tipo de criterio usado para definir una subpoblación de pacientes. Por ejemplo, una variante de diagnóstico no tóxica de una proteína citotóxica particular de la invención puede ser utilizada para diferenciar qué pacientes están en una clase o subpoblación de pacientes predicha para responder positivamente a una variante citotóxica de la misma proteína citotóxica de la invención. Por consiguiente, la presente descripción se refiere a procedimientos asociados para la identificación de pacientes, la estratificación de pacientes y el diagnóstico usando proteínas citotóxicas descritas en este documento y/o sus variantes no tóxicas.

IV. Variaciones en las secuencias de polipéptido de las proteínas de la invención que mantienen la estructura general y función

El experto en la materia reconocerá que pueden hacerse variaciones a las proteínas de la presente invención (y los

polinucleótidos que los codifican) sin disminuir sus actividades biológicas, por ejemplo, mediante el mantenimiento de la estructura general y la función de la proteína de la invención. Por ejemplo, algunas modificaciones pueden facilitar la expresión, purificación, propiedades farmacocinéticas y/o inmunogenicidad. Tales modificaciones son bien conocidas para el experto e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, los aminoácidos adicionales colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción convenientemente localizados o codones de terminación, y etiquetas de afinidad bioquímicas fusionados a cualquiera de los extremos para proporcionar la detección y/o purificación conveniente.

También se contempla en el presente documento la inclusión de residuos de aminoácidos adicionales en los extremos amino y/o carboxi, tales como secuencias para etiquetas de epítipo u otros restos. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden ser utilizados para diversos fines, incluyendo, por ejemplo, para facilitar la clonación, expresión, modificación postraduccional, síntesis, purificación, detección y/o administración. Los ejemplos no limitantes de etiquetas de epítipo y restos son: quitina, dominios de unión a proteína, sitios de escisión por enteropeptidasa, sitios de escisión por el Factor Xa, etiquetas FIAsh, etiquetas FLAG, proteínas verdes fluorescentes (GFP), restos de glutatión-S-transferasa, etiquetas de HA, dominios de proteína de unión a maltosa, etiquetas myc, etiquetas de polihistidina, etiquetas ReAsh, etiquetas strep, etiqueta strep-II, sitios de la proteasa TEV, dominios de tioredoxina, sitio de escisión por trombina y las etiquetas de epítipo V5.

En algunas de las realizaciones anteriores, la proteína de la presente invención es una variante en la que hay una o más sustituciones conservativas de aminoácidos introducidas en la región o regiones de polipéptido. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustitución conservativa" se refiere a que uno o más aminoácidos se sustituyen por otro residuo de aminoácido biológicamente similar. Los ejemplos incluyen la sustitución de residuos de aminoácidos con características similares, por ejemplo, aminoácidos pequeños, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos aromáticos (véase, por ejemplo, la Tabla B a continuación). Un ejemplo de una sustitución conservativa por un residuo que no se encuentra normalmente en péptidos y proteínas de mamífero endógenos es la sustitución conservativa de un residuo de arginina o lisina por, por ejemplo, ornitina, canavanina, aminoetilcisteína u otro aminoácido básico. Para más información relativa a sustituciones fenotípicamente silenciosas en péptidos y proteínas (véase, por ejemplo Bowie J et al, Science 247: 1306-1310 (1990)).

En el esquema de sustitución conservativa en la Tabla B a continuación, las sustituciones conservativas de ejemplo de aminoácidos se agrupan por propiedades fisicoquímicas - I: neutro, hidrófilo; II: ácidos y amidas; III: básico; IV: hidrófobo; V: aminoácido aromáticos voluminosos, VI hidrófilo no cargado, VII alifático sin carga, VIII no polar no cargado, IX asociado a cicloalqueno, X hidrófobo, XI polar, XII pequeño, XIII permite el giro, y XIV flexible. Por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen los siguientes: 1) S puede ser sustituido por C; 2) M o L pueden ser sustituidos por F; 3) Y puede ser sustituido por M; 4) Q o E pueden ser sustituidos por K; 5) N o Q pueden ser sustituidos por H; y 6) H puede ser sustituido por N.

TABLA B. Ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
A G P S T	D E Q N	H K R	C I L M V	F W Y	N Q S T	A G I L V	C M P	F H W Y	A C F G H I L M R T V W Y	C D E H K N Q R S T	A C D G N P S T V	A C D E G H K N Q R S P T	D E G K P Q R S T

En ciertas realizaciones, una proteína de la presente descripción puede comprender fragmentos funcionales o variantes de una región de polipéptido que tienen, como máximo, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de polipéptido mencionada en el presente documento, siempre que la región de polipéptido sustituida retenga la actividad biológica medible sola o como un componente de una proteína descrita en este documento. Las variantes de proteínas de la invención, tal como se definen en las reivindicaciones, están dentro del alcance de la invención como resultado del cambio de un polipéptido de la proteína de la invención mediante la alteración de uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos, tales como dentro de la región de unión o de la región efectora de la toxina Shiga, con el fin de conseguir las propiedades deseadas, tales como cambio de citotoxicidad, cambio de efectos citostáticos, cambio de la inmunogenicidad y/o cambio de la semivida en suero. Un polipéptido de una proteína de la invención puede estar adicionalmente con o

sin una secuencia señal.

En ciertas realizaciones, una proteína de la presente invención comparte al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de una proteína citada en el presente documento, siempre que mantenga una actividad biológica medible, tal como citotoxicidad, unión a biomolécula diana extracelular, catálisis enzimática o ruta subcelular. La región de unión de tipo inmunoglobulina puede diferir de las secuencias de aminoácidos de una proteína citados en el presente documento, siempre que conserve la funcionalidad de unión a su biomolécula diana extracelular. La funcionalidad de unión muy probablemente se mantendrá si las secuencias de aminoácidos de las CDR o ABRs son idénticas. Por ejemplo, una proteína está dentro del alcance de la reivindicación que comprende o consiste esencialmente en un 85% de identidad de aminoácidos a una proteína citada en este documento a los efectos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácidos que forman las CDR o ABR son ignorados. La funcionalidad de unión puede ser determinada por el experto en la materia utilizando técnicas estándar.

En ciertas realizaciones, la región efectora de la toxina Shiga puede alterarse para cambiar su actividad enzimática y/o la citotoxicidad, siempre que la región efectora de la toxina Shiga mantenga una o más de otras funciones efectoras de la toxina Shiga. Este cambio puede dar lugar o no a un cambio en la citotoxicidad de una proteína de la que la región efectora de la toxina Shiga alterada es un componente. Posibles alteraciones incluyen mutaciones en la región efectora de la toxina Shiga seleccionadas del grupo que consiste en: un truncamiento, delección, inversión, inserción, reordenamiento y sustitución.

La citotoxicidad de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga se puede alterar, reducir o eliminar por mutación o truncamiento. Las posiciones de tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114, y triptófano-203 etiquetados han demostrado ser importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1, y Stx2 (Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci USA. 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al, Biochemistry 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al, Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al., Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al, Microbiol Immunol. 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)). La mutación de glutamato-167 y arginina-170 eliminó la actividad enzimática de Slt-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas libre de células (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque utilizando la expresión *de novo* de Slt-I A1 en el retículo endoplásmico, mutando glutamato-167 y arginina-170 se eliminó la citotoxicidad del fragmento Slt-I A1 en ese nivel de expresión (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Un análisis de truncamiento demostró que un fragmento de StxA de los residuos 75 a 268 todavía conserva una actividad enzimática significativa *in vitro* (Haddad, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)). Un fragmento truncado de Slt-I A1 que contiene los residuos 1-239 mostró actividad enzimática significativa *in vitro* y la citotoxicidad por la expresión *de novo* en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). La expresión de un fragmento de Slt-I A1 truncado en los residuos 1-239 en el retículo endoplásmico no fue citotóxica porque no podía retrotranslocarse al citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades A de toxina Shiga han sido asignados a las siguientes posiciones de residuos: asparagina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170 y arginina-176 entre otros (Di, Toxicon 57: 525-39 (2011)). En particular, una construcción de doble mutante de Stx2A que contiene las mutaciones de glutamato-E167-a-lisina y arginina-176-a-lisina estaba completamente inactivada; mientras que, muchas mutaciones individuales en Stx1 y Stx2 mostraron una reducción de 10 veces en la citotoxicidad. Además, el truncamiento de Stx1A en 1-239 o 1-240 redujo su citotoxicidad, y de manera similar, el truncamiento de Stx2A en un residuo hidrofóbico conservado redujo su citotoxicidad.

Los residuos más críticos para la unión a ribosomas eucariotas y/o la inhibición de ribosomas eucariotas en la subunidad A de la toxina Shiga han sido asignados a los siguientes posiciones de residuos arginina-172, arginina-176, arginina-179, arginina-188, tirosina-189, valina -191 y leucina-233 entre otros (McCluskey A et al, PLoS One. 7: e31191 (2012)).

Los truncamientos de subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 son catalíticamente activos, capaces de inactivar los ribosomas enzimáticamente *in vitro* y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). El fragmento de subunidad A más pequeño de toxina Shiga que presenta actividad enzimática completa es un polipéptido compuesto de residuos 1-239 de Slt1A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque el fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que mostró que retenía actividad catalítica sustancial fueron los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)), un truncamiento de StxA expresado *de novo* dentro de una célula eucariota requiere sólo hasta el residuo 240 para alcanzar el citosol y ejercer la inactivación catalítica de ribosomas (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

En ciertas realizaciones derivadas de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2), estos cambios incluyen la sustitución de la asparagina en la posición 75, tirosina en la posición 77, tirosina en la posición 114, glutamato en la posición 167, arginina en la posición 170, arginina en la posición 176 y/o sustitución del triptófano en la posición 203. Ejemplos de tales sustituciones serán conocidos para el experto sobre la base de la técnica anterior, tales como asparagina en la posición 75 a alanina, tirosina en la posición 77 a serina, la sustitución de la tirosina en la posición 114 a serina, la sustitución del glutamato en la posición 167 en aspartato, la sustitución de la arginina en la posición

170 en alanina, la sustitución de la arginina en la posición 176 en lisina, y/o sustitución del triptófano en la posición 203 en alanina.

- 5 Las proteínas de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente a uno o más agentes adicionales, tales como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico conocidos en la técnica, incluyendo agentes tales como los descritos en el presente documento.

V. Producción, fabricación, y purificación de una proteína de la invención

- 10 Las proteínas de la presente invención pueden ser producidas utilizando técnicas de ingeniería bioquímica bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden fabricarse mediante procedimientos estándar de síntesis, mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. Las proteínas de la invención pueden producirse como proteínas de fusión, conjugados acoplados químicamente y/o combinaciones de los mismos, tales como, por ejemplo, un componente de
- 15 proteína de fusión acoplado de forma covalente a uno o más componentes. Por lo tanto, las proteínas de la invención pueden sintetizarse de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que comprenden: (1) sintetizar un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de la invención usando la metodología de fase sólida o fase líquida estándar, ya sea por pasos o por ensamblaje del fragmento, y aislar y purificar el producto del compuesto peptídico final; (2) expresar un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente de polipéptido de
- 20 una proteína de la invención en una célula huésped y recuperar el producto de expresión de la célula huésped o cultivo de células huésped; o (3) expresión *in vitro* libre de células de un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de la invención, y recuperar el producto de expresión; o mediante cualquier combinación de los procedimientos (1), (2) o (3) para obtener fragmentos del componente peptídico, uniendo posteriormente (por ejemplo, ligando) los fragmentos para obtener el componente de péptido, y recuperar el
- 25 componente peptídico.

- Puede ser preferible sintetizar un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de la presente invención por medio de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase líquida. Las proteínas de la invención pueden fabricarse convenientemente mediante procedimientos sintéticos estándar. Así, los péptidos se pueden sintetizar mediante
- 30 procedimientos, por ejemplo, que comprenden sintetizar el péptido mediante metodología de fase sólida o fase líquida estándar, ya sea paso a paso o mediante el ensamblaje del fragmento, y aislar y purificar el producto peptídico final. En este contexto, puede hacerse referencia a WO 1998/11125 o, entre otros, Fields G et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis (Synthetic Peptides, Grant G, ed., Oxford University Press, Reino Unido, segundoed., 2002) y los ejemplos de síntesis en los mismos.

- 35 Las proteínas de la presente invención se pueden preparar (producir y purificar) usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. En general, se describen procedimientos para preparar polipéptidos mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que comprende el polinucleótido codificante y recuperar el polipéptido del cultivo de células, por ejemplo, en Sambrook J et al, Molecular Cloning: A Laboratory
- 40 Manual Cold Spring Harbor Laboratory (Press, NY, Estados Unidos, 1989); Dieffenbach C et al, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., 1995). Cualquier célula huésped adecuada puede utilizarse para producir una proteína de la invención. Las células huésped pueden ser células transfectadas, transformadas, transducidas o infectadas de forma estable o transitoria, con uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de un polipéptido de la invención. Además, una proteína de la invención se puede
- 45 producir mediante la modificación del polinucleótido que codifica la proteína de la invención, lo que da lugar a la alteración de uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos con el fin de conseguir las propiedades deseadas, tales como cambio de citotoxicidad, cambio de efectos citostáticos, cambio de inmunogenicidad, y/o cambio de semivida en suero.

- 50 Existe una amplia variedad de sistemas de expresión que pueden seleccionarse para producir una proteína de la presente invención. Por ejemplo, los organismos huésped para la expresión de proteínas de la invención incluyen procariotas, tales como *E. coli* y *B. subtilis*, células eucariotas, tales como levaduras y hongos filamentosos (como *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *A. awamori*, y *K. lactis*), algas (como *C. reinhardtii*), líneas celulares de insecto, células de mamífero (como células CHO), líneas celulares de la planta, y organismos eucariotas, tales como plantas
- 55 transgénicas (como *A. thaliana* y *N. benthamiana*).

- Por consiguiente, la presente descripción también proporciona procedimientos para producir una proteína descrita en este documento de acuerdo con los procedimientos anteriormente citados y el uso de (i) un polinucleótido que codifica una parte o la totalidad de una proteína descrita en este documento o un componente de polipéptido de la
- 60 misma, (ii) un vector de expresión que comprende al menos un polinucleótido descrito en el presente documento capaz de codificar parte o todo de una proteína descrita en el presente documento o un componente de polipéptido de la misma cuando se introduce en una célula huésped adecuada o un sistema de expresión libre de células, y/o (iii) una célula huésped que comprende un polinucleótido o vector de expresión descrito en el presente documento.

- 65 Cuando un polipéptido o proteína se expresa utilizando técnicas recombinantes en una célula huésped o sistema libre de células, es ventajoso separar (o purificar) el polipéptido o proteína deseado de otros componentes, tales

como factores de la célula huésped, con el fin de obtener preparaciones que sean de alta pureza o sean sustancialmente homogéneas. La purificación se puede lograr mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como técnicas de centrifugación, técnicas de extracción, cromatografía y técnicas de fraccionamiento (por ejemplo, separación por tamaños mediante filtración en gel, separación de cargas mediante columna de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía en sílice o resinas de intercambio catiónico, tales como DEAE y similares, cromatografía de exclusión, y cromatografía con proteína A Sepharose para eliminar los contaminantes), y técnicas de precipitación (por ejemplo precipitación con etanol o precipitación con sulfato de amonio). Se puede utilizar cualquier cantidad de técnicas de purificación bioquímica para aumentar la pureza de una proteína de la invención. En ciertas realizaciones, las proteínas de la invención opcionalmente se pueden purificar en formas homomultiméricas (es decir, un complejo de proteínas de dos o más proteínas idénticas) o en formas heteromultiméricas (es decir, un complejo de proteínas de dos o más proteínas no idénticas).

En los ejemplos siguientes están descripciones de ejemplos no limitativos de procedimientos para producir una proteína de la presente invención.

VI. Composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden una proteína de la invención

La proteína de la invención se puede usar sola o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en una composición farmacéutica, para el tratamiento o la profilaxis de afecciones, enfermedades, trastornos o síntomas descritos en más detalle a continuación (por ejemplo, cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, anomalías del crecimiento, trastornos inmunitarios e infecciones microbianas). La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende una proteína de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, según la presente invención, junto con un al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención puede comprender formas homomultiméricas y/o heteromultiméricas de las proteínas de la invención. Las composiciones farmacéuticas serán útiles en procedimientos de tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad, afección, trastorno o síntoma que se describe en más detalle a continuación. Cada una de dicha enfermedad, afección, trastorno o síntoma se prevé que sea una realización separada con respecto a los usos de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La descripción proporciona además composiciones farmacéuticas para usar en al menos un procedimiento de tratamiento, tal como se describe en más detalle a continuación.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente para referirse a cualquier organismo, habitualmente vertebrados, tales como seres humanos y animales, que presenta síntomas, signos y/o indicaciones de al menos una enfermedad, trastorno o afección. Estos términos incluyen mamíferos, tales como los ejemplos, no limitantes, de primates, animales de ganado (por ejemplo, ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo ratones, conejos, ratas, etc.).

Tal como se usa en el presente documento, "tratar", "que trata" o "tratamiento" y las variantes gramaticales de los mismos se refieren a una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los términos pueden referirse a retardar la aparición o la velocidad de desarrollo de una afección, trastorno o enfermedad, reducir o aliviar los síntomas asociados con los mismos, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de cualquiera de los anteriores. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, la reducción o alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (por ejemplo, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratar", "que trata" o "tratamiento" también pueden significar prolongar la supervivencia en relación con el tiempo de supervivencia esperado si no se recibe tratamiento. Un sujeto (por ejemplo un ser humano) en necesidad de tratamiento puede ser por tanto un sujeto ya aquejado de la enfermedad o trastorno en cuestión. Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" incluyen la inhibición o la reducción de un aumento en la gravedad de un estado o síntomas patológicos con respecto a la ausencia de tratamiento, y no está necesariamente destinado a implicar el cese completo de la enfermedad, trastorno o estado pertinentes. Con respecto a los tumores y/o cánceres, el tratamiento incluye reducciones en la carga tumoral global y/o el tamaño del tumor individual.

Tal como se usa en este documento, los términos "prevenir", "que previene", "prevención" y variantes gramaticales de los mismos se refieren a un procedimiento para prevenir el desarrollo de, o alterar la patología de, una afección, enfermedad o trastorno. En consecuencia, la "prevención" puede referirse a las medidas profilácticas o preventivas. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, la prevención o ralentización de los síntomas, progresión o desarrollo de una enfermedad, ya sea detectable o indetectable. Un sujeto (por ejemplo un ser humano) en necesidad de la prevención puede ser por tanto un sujeto aún no afectado por la enfermedad o trastorno en cuestión. El término "prevención" incluye retardar la aparición de la enfermedad en relación con la ausencia de tratamiento, y no está necesariamente destinado a implicar la prevención permanente de la enfermedad, trastorno o afección pertinentes. Por lo tanto "prevenir" o

"prevención" de una enfermedad puede, en ciertos contextos, referirse a la reducción del riesgo de desarrollar la afección, o prevenir o retrasar la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad o dosis de una composición (por ejemplo, una composición o agente terapéutico) que produce al menos un efecto terapéutico deseado en un sujeto, tal como la prevención o el tratamiento de una afección objetivo o alivio beneficioso de un síntoma asociado con la enfermedad. La cantidad terapéuticamente eficaz más deseable es una cantidad que producirá una eficacia deseada de un tratamiento particular seleccionado por un experto en la técnica para un sujeto dado en necesidad del mismo. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores entendidos por el experto en la materia, incluyendo, pero no limitado a, las características del compuesto terapéutico (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo edad, sexo, tipo de enfermedad, estadio de la enfermedad, condición física general, respuesta a una dosis dada y tipo de medicación), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables en la formulación y la vía de administración. Un experto en el sector clínico y farmacológico será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva a través de la experimentación de rutina, es decir, mediante el control de la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y el ajuste de la dosificación en consecuencia (véase, por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro A, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, Estados Unidos, 19ª ed., 1995)).

Las composiciones de diagnóstico de la presente invención comprenden una proteína de la invención y uno o más agentes promotores de detección, tal como se define en las reivindicaciones. Varios agentes promotores de la detección son conocidos en la técnica, tales como isótopos, colorantes, agentes colorimétricos, agentes potenciadores de contraste, agentes fluorescentes, agentes bioluminiscentes y agentes magnéticos. Estos agentes pueden ser incorporados en la proteína de la invención en cualquier posición. La incorporación del agente puede ser a través de un residuo o residuos de aminoácidos de la proteína de la invención o a través de algún tipo de unión conocido en la técnica, incluyendo a través de enlazadores y/o quelantes. La incorporación del agente es de tal manera que permite la detección de la presencia de la composición de diagnóstico en una pantalla, ensayo, procedimiento de diagnóstico y/o técnica de imagen.

Cuando se produce o fabrica una composición de diagnóstico de la presente invención, una proteína de la invención puede unirse directa o indirectamente a uno o más agentes promotores de la detección. Hay numerosos agentes promotores de la detección conocidos para el experto que pueden unirse operativamente a las proteínas de la presente invención para los procedimientos de recopilación de información, tales como para aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, trastornos o afecciones de un organismo (véase, por ejemplo Cai W et al, J Nucl Med 48: 304-10 (2007); Nayak T, Brechbiel M, Bioconjug Chem. 20: 825-41 (2009); Paudyal P et al, Oncol Rep. 22: 115-9 (2009); Qiao J et al, PLoS ONE 6: e18103 (2011); Sano K et al, Breast Cancer Res. 14: R61 (2012)). Por ejemplo, los agentes promotores de la detección incluyen agentes de contraste que mejoran la imagen, tales como colorantes fluorescentes (por ejemplo Alexa680, verde de indocianina y Cy5.5), isótopos y radionúclidos, tales como ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F , ^{32}P , ^{51}Mn , ^{52}Mn , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{73}Se , ^{75}Br , ^{76}Br , ^{82}mRb , ^{83}Sr , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , ^{94}mTc , ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{110}In , ^{111}In , ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{154}Gd , ^{155}Gd , ^{156}Gd , ^{157}Gd , ^{158}Gd , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , y ^{223}Rn , iones paramagnéticos, tales como cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III), metales, tales como lantano (III), oro (III), plomo (II) y bismuto (III), agentes que mejoran el contraste por ultrasonidos, tales como liposomas, agentes radiopacos, tales como compuestos de bario, galio y talio. Los agentes promotores de la detección pueden incorporarse directa o indirectamente usando un grupo funcional intermediario, tales como quelantes como 2-bencil DTPA, PAMAM, NOTA, DOTA, TETA, análogos de los mismos, y equivalentes funcionales de cualquiera de los anteriores (ver Leyton J et al., Clin Cancer Res 14: 7488-96 (2008)).

Existen numerosas técnicas estándar conocidas para el experto para la incorporación, adhesión y/o conjugación de diversos agentes promotores de la detección a proteínas, especialmente a inmunoglobulinas y dominios derivados de inmunoglobulina (Wu A, Methods 65: 139-47 (2014)). De manera similar, hay numerosas estrategias de imágenes conocidas para el experto, tales como las técnicas de obtención de imágenes *in vivo* no invasivas comúnmente usadas en el campo médico, por ejemplo: formación de imágenes por tomografía computarizada (TC), formación de imágenes ópticas (incluyendo obtención de imágenes de forma directa, fluorescente y bioluminiscente), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), ultrasonidos con tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT) de ultrasonidos, y obtención de imágenes por tomografía computarizada con rayos X (ver Kaur S et al, Cancer Lett. 315: 97-111 (2012), para una revisión).

Producción o fabricación de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico que comprende una proteína de la invención

Sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las proteínas de la presente invención están igualmente dentro del alcance de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones.

El término "solvato" en el contexto de la presente invención se refiere a un complejo de estequiometría definida

formado entre un soluto (en este caso, una molécula de la invención o sal farmacéuticamente aceptable de la misma de acuerdo con la invención) y un disolvente. El disolvente en esta conexión puede, por ejemplo, ser agua, etanol u otra especie orgánica farmacéuticamente aceptable, típicamente de peso molecular pequeño, tal como, pero no limitado a, ácido acético o ácido láctico. Cuando el disolvente en cuestión es agua, un solvato de este tipo se conoce normalmente como un hidrato.

Las proteínas de la presente invención, o sales de las mismas, se pueden formular como composiciones farmacéuticas preparadas para almacenamiento o administración, que típicamente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la invención, o una sal de la misma, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. (A. Gennaro, ed., 1985)). Tal como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción, y similares, fisiológicamente aceptables, es decir, compatibles. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los usados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, y transdérmica). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En ciertas realizaciones, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración seleccionada, la proteína de la invención u otro componente farmacéutico pueden recubrirse en un material destinado a proteger el compuesto de la acción del pH bajo y otras condiciones de inactivación natural en las que la proteína activa se puede encontrar cuando se administra a un paciente por una vía de administración particular.

Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. En dicha forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria puede ser también una cápsula, píldora o el propio comprimido, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas envasadas. Puede proporcionarse en forma inyectable de dosis única, por ejemplo en forma de una pluma. Las composiciones se pueden formular mediante cualquier vía y medios de administración adecuados. Los modos de administración subcutáneos o transdérmicos pueden ser particularmente adecuados para las proteínas terapéuticas descritas en este documento.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También pueden ser deseables agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Una composición farmacéutica de la presente invención también incluye opcionalmente un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los antioxidantes farmacéuticamente aceptables de ejemplo son antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o una combinación de diferentes proteínas descritas en este documento, o un éster, sal o amida de cualquiera de los anteriores, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones terapéuticas son típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de

dispersión que contiene, por ejemplo, agua, alcohol, tal como etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), o cualquier mezcla adecuada. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de agentes tensioactivos de acuerdo con la química de la formulación bien conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, pueden ser deseables en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede provocarse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación intradérmica o subcutánea incluyen típicamente uno o más de: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes de ajuste de la tonicidad, tales como, por ejemplo, cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, o tampones con citrato, fosfato, acetato y similares. Dichas preparaciones se pueden encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de una proteína de la invención en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes descritos anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración con esterilización. Las dispersiones se pueden preparar mediante la incorporación de un compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión y los otros ingredientes, tales como los descritos anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo además de cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada estéril de los mismos.

Cuando se diseña una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la invención para ser administrada mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en forma de una solución acuosa libre de pirógenos parenteralmente aceptable. Los procedimientos para preparar soluciones de proteína parenteralmente aceptables, teniendo en consideración un pH, isotonicidad, estabilidad, y similares apropiados están dentro de la experiencia en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea contiene, además de agentes de unión, un vehículo isotónico, tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer con lactato, u otro vehículo conocido en la técnica. Una composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes, u otros aditivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Tal como se describe en otra parte en el presente documento, una proteína de la presente invención o composición de la misma (por ejemplo, composición farmacéutica o de diagnóstico) se pueden preparar con vehículos que protegerán la composición contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulada. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (Robinson J, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, US, 1978)).

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención (por ejemplo, composición farmacéutica o de diagnóstico) puede formularse para asegurar una distribución deseada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica excluye muchos compuestos grandes y/o hidrófilos. Para direccionar una proteína terapéutica o composición de la invención a una localización particular *in vivo*, se puede formular, por ejemplo, en liposomas que pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, mejorando así la administración dirigida de fármacos. Los restos de enrutamiento de ejemplo incluyen folato o biotina; manósidos; anticuerpos; receptor de la proteína A surfactante; p120 catenina y similares.

Las composiciones farmacéuticas incluyen formulaciones parenterales diseñadas para ser utilizadas como implantes o sistemas de partículas. Los ejemplos de implantes son formulaciones de depósito compuestas de componentes poliméricos o hidrófobos, tales como emulsiones, resinas de intercambio iónico y soluciones de sales solubles. Ejemplos de sistemas de partículas son dendrímeros, liposomas, microesferas, micropartículas, nanocápsulas, nanopartículas, nanovarías, nanoesferas, micelas poliméricas y nanotubos (véase, por ejemplo Honda M et al, Int J Nanomedicine. 8: 495-503 (2013); Sharma A et al, Biomed Res Int 2013: 960 821 (2013); Ramishetti S, Huang L, Ther Deliv 3: 1429-1445 (2012)). Las formulaciones de liberación controlada se pueden preparar utilizando polímeros sensibles a iones, tales como, por ejemplo, liposomas, polaxámero 407 e hidroxiapatita. Las formulaciones de partículas y de polímero pueden comprender un agente o agentes de alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, tal como, por ejemplo, diversos péptidos y proteínas como citolisinas, agentes derivados de toxina, agentes derivados de virus, péptidos biomiméticos sintéticos y agentes químicos

(véase, por ejemplo Varkouhi et al., J control Release 151: 220-8 (2011); J Pirie C et al, Mol cáncer Ther 12: 1774-1782 (2013)).

VII. Polinucleótidos, vectores de expresión y células huésped

La divulgación proporciona además polinucleótidos que codifican proteínas descritas en el presente documento o partes funcionales de los mismos. El término "polinucleótido" es equivalente a la expresión "ácidos nucleicos", incluyendo ambos polímeros de ácidos desoxirribonucleicos (ADN), polímeros de ácidos ribonucleicos (ARN), análogos de estos ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos. El polinucleótido de la invención puede ser de cadena simple, doble o de cadena triple. Los polinucleótidos descritos se dan a conocer específicamente para incluir todos los polinucleótidos que codifican una proteína de ejemplo de la invención, por ejemplo, teniendo en cuenta la oscilación conocida para ser tolerada en la tercera posición de los codones de ARN, aunque codifican el mismo aminoácido como un codón diferente de ARN (ver Stothard P, Biotechniques 28: 1102-4 (2000)).

La divulgación que proporciona polinucleótidos que codifican una proteína descrita en el presente documento, o un fragmento o derivado de los mismos. Los polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que es al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más, idéntico a un polipéptido que comprende una de las secuencias de aminoácidos de la proteína descrita en este documento. La divulgación también proporciona polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que codifica una proteína descrita en el presente documento, o un fragmento o derivado de la misma, o el antisentido o complemento de cualquiera de tales secuencias.

Los derivados o análogos de los polinucleótidos (o proteínas) descritos en el presente documento incluyen, entre otros, moléculas de polinucleótido (o polipéptido) que tienen regiones que son sustancialmente homólogas a los polinucleótidos o proteínas descritas en el presente documento, por ejemplo en al menos aproximadamente 45%, 50%, 70%, 80%, 95%, 98%, o incluso 99% de identidad (con una identidad preferida de 80-99%) sobre una secuencia de polinucleótido o polipéptido del mismo tamaño o cuando se compara con una secuencia alineada en la que la alineación es realizada por un programa de homología de ordenador conocido en la técnica. Un programa de ejemplo es el programa GAP (Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Park Investigación, Madison, WI, EE.UU.) utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith T, Waterman M, Adv Appl Math 2: 482-9 (1981). También se describen polinucleótidos capaces de hibridar con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas descritas en el presente documento en condiciones rigurosas (véase por ejemplo Ausubel F et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Nueva York, NY, US, 1993)), y por debajo. Las condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY, US, Ch. Sec. 6.3.1-6.3.6 (1989)).

La presente divulgación proporciona adicionalmente vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento. Los polinucleótidos capaces de codificar las proteínas descritas en el presente documento pueden insertarse en vectores conocidos, incluyendo plásmidos bacterianos, vectores virales y vectores de fago, utilizando materiales y procedimientos bien conocidos en la técnica para producir vectores de expresión. Tales vectores de expresión incluirán los polinucleótidos necesarios para apoyar la producción de las proteínas contempladas descritas en el presente documento dentro de cualquier célula huésped de los sistemas de expresión de elección o libre de células (por ejemplo pTxb1 y pIVEX2.3 descritos en los Ejemplos a continuación). Los polinucleótidos específicos que comprenden los vectores de expresión para su uso con tipos de células específicas huésped o sistemas de expresión libres de células son bien conocidos para una persona de experiencia ordinaria en la técnica, pueden determinarse utilizando experimentación de rutina, o pueden adquirirse.

El término "vector de expresión", como se usa aquí, se refiere a un polinucleótido, lineal o circular, que comprende una o más unidades de expresión. El término "unidad de expresión" se refiere a un segmento de polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y es capaz de proporcionar la expresión del segmento de ácido nucleico en una célula huésped. Una unidad de expresión comprende típicamente un promotor de transcripción, un marco de lectura abierto que codifica el polipéptido de interés, y un terminador de la transcripción, todos en configuración operativa. Un vector de expresión contiene una o más unidades de expresión. Por lo tanto, en el contexto de la presente divulgación, un vector de expresión que codifica una proteína descrita en el presente documento que comprende una cadena de polipéptido única (por ejemplo, un scFv genéticamente recombinado con una región efectora de la toxina Shiga) incluye al menos una unidad de expresión para la cadena de polipéptido única, mientras que una proteína de la invención que comprende, por ejemplo, dos o más cadenas de polipéptidos (por ejemplo, una cadena que comprende un dominio V_L y una segunda cadena que comprende un dominio V_H unido a una región efectora de la toxina) incluye al menos dos unidades de expresión, una para cada una de las dos cadenas de polipéptido de la proteína. Para la expresión de proteínas de múltiples cadenas, una unidad de expresión para cada cadena de polipéptido también puede estar contenida por separado en diferentes vectores de expresión (por ejemplo, la expresión puede conseguirse con una única célula huésped en la que se han introducido vectores de expresión para cada cadena de polipéptido).

Los vectores de expresión capaces de dirigir la expresión transitoria o estable de polipéptidos y proteínas son bien conocidos en la técnica. Los vectores de expresión generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia o péptido señal heterólogo, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción, cada uno de los cuales es bien conocido en la técnica. Las secuencias opcionales de regulación de control, secuencias de integración, y marcadores útiles que se pueden emplear son conocidos en la técnica.

El término "célula huésped" se refiere a una célula que puede apoyar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas, tales como *E. coli* o células eucarióticas (por ejemplo células de levaduras, insectos, anfibios, aves o mamífero). La creación y aislamiento de líneas de células huésped que comprenden un polinucleótido de la invención o son capaces de producir una proteína descrita en el presente documento puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica.

Las proteínas de la presente divulgación pueden ser variantes o derivados de las proteínas descritas en el presente documento que son producidas por la modificación del polinucleótido que codifica una proteína descrita mediante la alteración de uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos que pueden hacerlas más adecuadas para lograr las propiedades deseadas, tales como la expresión más óptima por una célula huésped.

VIII. Dispositivos de administración y Kits

En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a un dispositivo que comprende una o más composiciones de materia de la invención, tal como una composición farmacéutica, para la administración a un sujeto. Por lo tanto, un dispositivo de suministro que comprende uno o más compuestos descritos en el presente documento se puede usar para administrar a un paciente una composición de materia descrita en el presente documento mediante diversos procedimientos de administración, incluyendo: intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal; administración oral; administración transdérmica; administración pulmonar o transmucosa; administración por implante, bomba osmótica, cartucho o microbomba; o por otros medios reconocidos por una persona de experiencia en la técnica.

También dentro del alcance de la invención es un kit como se define en las reivindicaciones, que comprende: (i) una proteína de la invención, (ii) una composición farmacéutica de la invención, (iii) una composición de diagnóstico de la invención, (iv) un polinucleótido de la invención, (v) un vector de expresión de la invención, o (vi) una célula huésped de la invención, y un reactivo adicional y/o dispositivo de administración farmacéutica; y opcionalmente, el envase y las instrucciones de uso. Los kits pueden ser útiles para la administración del fármaco y/o la recogida de información de diagnóstico. Un kit de la invención puede comprender opcionalmente al menos un reactivo adicional (por ejemplo, patrones, marcadores y similares). Los kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El kit puede comprender además reactivos y otras herramientas para la detección de un tipo de célula (por ejemplo, células tumorales) en una muestra o en un sujeto, o para el diagnóstico de si un paciente pertenece a un grupo que responde a una estrategia terapéutica que hace uso de una proteína, composición o el procedimiento relacionado de la invención, tal como se describe en el presente documento.

IX. Procedimientos para utilizar una proteína de la invención o una composición de la misma

En general, un objetivo de la invención es proporcionar una proteína de la invención, o una composición farmacéutica que comprende la misma, para usar en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto con necesidad de las mismas, tales como ciertos tipos de cáncer, tumores, trastornos inmunitarios, infecciones microbianas u otras afecciones patológicas mencionadas en el presente documento. En consecuencia, la presente descripción proporciona procedimientos de utilización de las proteínas y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento para la eliminación selectiva de células, para la liberación de materiales exógenos adicionales en las células diana, para el marcaje de los interiores de las células diana, para la recogida de información de diagnóstico, y para tratar enfermedades, trastornos y afecciones, tal como se describe en el presente documento.

En particular, un objetivo de la descripción es proporcionar tales agentes farmacológicamente activos, composiciones y/o procedimientos que tienen ciertas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o procedimientos que se conocen actualmente en la técnica. En consecuencia, la presente descripción proporciona procedimientos de utilización de proteínas descritas en el presente documento que se caracterizan por secuencias de polipéptidos especificadas y composiciones farmacéuticas de los mismos. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias polipeptídicas en SEQ ID NOs: 1-34 puede utilizarse específicamente como un componente de la proteína usada en los procedimientos siguientes.

La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para eliminar una célula que comprende la etapa de poner en contacto la célula con una proteína de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas de la invención se pueden usar para eliminar un tipo de célula específica tras el contacto de una célula o células con una de las composiciones de materia reivindicadas. En ciertas realizaciones,

una proteína de la presente invención se puede usar para eliminar tipos de células específicas en una mezcla de diferentes tipos de células, tales como mezclas que comprenden células cancerosas, células infectadas y/o células hematológicas. En ciertas realizaciones, una proteína de la presente invención se puede usar para eliminar células cancerosas en una mezcla de diferentes tipos de células. En ciertas realizaciones, una proteína de la presente invención puede usarse para eliminar tipos de células específicas en una mezcla de diferentes tipos de células, tales como tejidos pretrasplante. En ciertas realizaciones, una proteína de la presente invención puede usarse para eliminar tipos de células específicas en una mezcla de tipos de células, tales como material de tejido preadministración con fines terapéuticos. En ciertas realizaciones, una proteína de la presente invención puede usarse para eliminar selectivamente las células infectadas por virus o microorganismos, o en cualquier caso, eliminar selectivamente células que expresan una biomolécula diana extracelular particular, tal como una biomolécula de la superficie celular. Las proteínas de la invención tienen diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, usos en el agotamiento de tipos de células no deseadas de tejidos, ya sea *in vitro* o *in vivo*, usos en la modulación de la respuesta inmunitaria para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, uso como agentes antivirales, usos como agentes antiparasitarios y usos en la purga de tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas.

En ciertas realizaciones, una proteína o composición farmacéutica de la presente invención, solas o en combinación con otros compuestos o composiciones farmacéuticas, pueden mostrar una potente actividad de eliminación de células cuando se administran a una población de células, *in vitro* o *in vivo*, en un sujeto, tal como en un paciente en necesidad de tratamiento. Al dirigir la liberación de las regiones de la toxina Shiga enzimáticamente activas utilizando regiones de unión de alta afinidad a tipos de células de cáncer, esta potente actividad de eliminación de células puede restringirse para eliminar específica y selectivamente ciertos tipos de células dentro de un organismo, tales como ciertas células cancerosas, células neoplásicas, células malignas, células tumorales no malignas, o células infectadas.

La presente descripción proporciona un procedimiento para eliminar una célula en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente al menos una proteína descrita en el presente documento o una composición farmacéutica de la misma.

Ciertas realizaciones de la proteína de la invención o composiciones farmacéuticas de la misma se pueden utilizar para eliminar una célula de cáncer y/o célula tumoral en un paciente mediante el reconocimiento de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplada físicamente con una célula de cáncer y/o tumoral. Los términos "célula de cáncer" o "célula cancerosa" se refieren a diversas células neoplásicas que crecen y se dividen de una forma anormalmente acelerada y estará claro para la persona experta. El término "célula tumoral" incluye tanto las células malignas como no malignas (por ejemplo, las células tumorales benignas no cancerosas, células madre de "cáncer" no cancerosas, células madre tumorales, células pre-malignas iniciadoras del cáncer, células iniciadoras del tumor, o células tumorigénicas, todas ellas pueden dar lugar a células descendentes que se convierten en células tumorales y/o cancerosas malignas, pero son incapaces de hacer metástasis por su propia cuenta (véase, por ejemplo Martínez-Climent J et al, Haematologica 95: 293-302 (2010)). En general, los cánceres y/o tumores se pueden definir como enfermedades, trastornos o afecciones que son susceptibles de tratamiento y/o prevención. Los cánceres y tumores (ya sea malignos o no malignos) que se componen de células de cáncer y/o células tumorales que pueden beneficiarse de los procedimientos y composiciones de la invención serán evidentes para el experto. Las células neoplásicas a menudo se asocian con uno o más de los siguientes: crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión de tejido local, angiogénesis y metástasis.

Ciertas realizaciones de las proteínas de la invención o composiciones farmacéuticas de las mismas se pueden utilizar para eliminar una célula inmunitaria (ya sea sana o maligna) en un paciente mediante el reconocimiento de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplada físicamente con una célula inmunitaria.

Ciertas realizaciones de las proteínas de la invención o composiciones farmacéuticas de las mismas se pueden utilizar para eliminar una célula infectada en un paciente mediante el reconocimiento de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplada físicamente con una célula infectada.

Las proteínas de la invención o composiciones de la invención de las mismas se pueden utilizar para los fines de purga de poblaciones de células de pacientes (por ejemplo, médula ósea) de células B y/o células T infectadas, malignas, neoplásicas, o en cualquier caso, no deseadas y, a continuación, perfundir el material agotado en células B y/o células T en el paciente (véase, por ejemplo van Heeckeren W et al, Br J Haematol 132: 42-55 (2006); Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol. 39: 629-42 (2012)).

Las proteínas de la invención o composiciones farmacéuticas de las mismas se pueden utilizar para los propósitos de agotamiento ex vivo de las células B y/o células T de poblaciones de células aisladas extraídas de un paciente. En un ejemplo no limitante, la proteína de la invención puede usarse en un procedimiento para la profilaxis de rechazo de trasplante de órgano y/o tejido, en el que el órgano o tejido del donante es perfundido antes del trasplante con una proteína citotóxica de la invención o una composición farmacéutica la misma a fin de purgar el órgano de células B y/o células T donantes no deseadas (véase, por ejemplo Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).

Las proteínas de la invención o las composiciones farmacéuticas de las mismas pueden utilizarse para los fines de agotamiento de células B y/o células T de una población celular donante como profilaxis contra la enfermedad de injerto contra huésped, y la inducción de la tolerancia, en un paciente que se somete a un trasplante de médula ósea y/o células madre.

5 Ciertas realizaciones de la proteína de la presente invención o composiciones farmacéuticas de la misma se pueden utilizar para eliminar una célula infectada en un paciente mediante el reconocimiento de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplada físicamente con una célula infectada.

10 Ciertas realizaciones de la proteína de la presente invención o composiciones farmacéuticas de la misma se pueden utilizar para eliminar una célula o células de un parásito multicelular. En ciertas realizaciones adicionales, la eliminación celular se produce mientras el parásito multicelular está presente en un organismo o sujeto huésped. En ciertas realizaciones adicionales, la proteína de la invención puede usarse para eliminar un helminto, tal como, por ejemplo, un platelminto, nematelminto, cestodo, monogeneos, nematodo y/o trematodo.

15 Adicionalmente, la presente invención proporciona una proteína de la invención o una composición farmacéutica de la invención para usar en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente, tal como se expone en las reivindicaciones. Las enfermedades, trastornos y afecciones contempladas que se pueden tratar incluyen cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, anormalidades de crecimiento, trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas. La administración de una "dosis terapéuticamente eficaz" de una proteína de la invención puede dar lugar a una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido al sufrimiento por la enfermedad.

25 La cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la presente invención dependerá de la vía de administración, el tipo de mamífero a tratar y las características físicas del paciente específico bajo consideración. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas. Esta cantidad y el procedimiento de administración pueden adaptarse para conseguir una eficacia óptima y pueden depender de factores, tales como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores bien conocidos por los expertos en las técnicas médicas. El régimen de dosificación y el tamaño de dosificación más apropiados para uso humano pueden estar dirigidos por los resultados obtenidos por la presente invención, y se pueden confirmar en ensayos clínicos diseñados adecuadamente. Se puede determinar un protocolo de dosificación y tratamiento eficaz mediante medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y a continuación aumentando la dosis, mientras se monitorizan los efectos, y variando sistemáticamente el régimen de dosificación también. Un médico puede tomar en consideración numerosos factores cuando se determina una dosis óptima para un sujeto determinado. Estas consideraciones son conocidas para el experto.

40 Una vía de administración aceptable puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, aerosol, enteral, nasal, oftálmica, oral, parenteral, rectal, vaginal o transdérmica (por ejemplo, la administración tópica de una crema, gel o pomada, o por medio de un parche transdérmico). "Administración parenteral" se asocia típicamente con inyección en un sitio de acción deseado o en comunicación con el mismo, incluyendo administración infraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal o transtraqueal.

45 Para la administración de una composición farmacéutica de la invención, el intervalo de dosis será generalmente de aproximadamente 0,0001 a 100 miligramos por kilogramo (mg/kg), y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal del huésped. Las dosificaciones de ejemplo pueden ser 0,25 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo es una administración una vez o dos veces al día, o una administración una o dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos o tres meses o una vez cada tres a 6 meses. Las dosificaciones pueden seleccionarse y reajustarse por el profesional experto de la salud según se requiera para maximizar el beneficio terapéutico para un paciente particular.

55 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar al mismo paciente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, 2-5 días, semanas, meses, cada dos o tres meses, cada seis meses o cada año. Los intervalos entre administraciones también pueden ser irregulares, basándose en la regulación de los niveles en sangre u otros marcadores en el sujeto o paciente. Los regímenes de dosificación incluyen la administración intravenosa de 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal con el compuesto administrado cada dos a cuatro semanas durante seis dosis, a continuación, cada tres meses a 3 mg/kg de peso corporal o 1 mg/kg de peso corporal.

65 Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a través de una o más vías de administración, utilizando una o más de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Tal como se entenderá por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados

deseados. Las vías de administración para las proteínas de la presente invención o composiciones de las mismas incluyen, por ejemplo, administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. En otras realizaciones, una proteína o composición farmacéutica de la invención pueden administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o por mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, o tópica.

Las proteínas o composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar con una o más de una variedad de dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención están en la técnica, incluyendo, por ejemplo, bombas de microinfusión implantables para la liberación a velocidad controlada; dispositivos para la administración a través de la piel; bombas de infusión para la liberación a una velocidad de infusión precisa; dispositivos de infusión implantables de flujo variable para la administración continua de fármacos; y sistemas de administración osmótica de fármacos. Estos y otros implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

Una proteína o composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Una terapia de combinación puede incluir una proteína de la invención o composición farmacéutica de la misma en combinación con al menos otro agente terapéutico seleccionado en base al paciente en particular, la enfermedad o afección a ser tratada. Ejemplos de dichos otros agentes incluyen, entre otros, un agente anticáncer o quimioterapéutico citotóxico, un agente antiinflamatorio o antiproliferativo, un agente antimicrobiano o antiviral, factores de crecimiento, citoquinas, un analgésico, una molécula o polipéptido pequeño terapéuticamente activo, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo clásico o fragmento del mismo, o una molécula de ácido nucleico que modula una o más vías de señalización, y agentes terapéuticos de modulación similares que pueden complementar o, en cualquier caso, ser beneficiosos en un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico.

El tratamiento de un paciente con una proteína o composición farmacéutica de la invención conduce preferiblemente a la muerte celular de las células diana y/o la inhibición del crecimiento de células diana. Por tanto, las proteínas de la invención, y composiciones farmacéuticas que las comprenden serán útiles para tratar una variedad de trastornos patológicos en los que eliminar o agotar las células diana puede ser beneficioso, tales como, entre otros, cánceres, tumores, otras anomalías de crecimiento, trastornos inmunitarios y células infectadas. La presente descripción proporciona procedimientos para la supresión de la proliferación celular y el tratamiento de trastornos de células, incluyendo neoplasia, células B hiperactivas y células T hiperactivas.

En ciertas realizaciones, las proteínas y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para tratar o prevenir cánceres, tumores (malignos y no malignos), anomalías de crecimiento, trastornos del sistema inmunitario y las infecciones microbianas. El procedimiento anterior *ex vivo* puede combinarse con el procedimiento *in vivo* anterior para proporcionar procedimientos de tratamiento o prevención del rechazo en receptores de trasplante de médula ósea, y para conseguir tolerancia inmunológica.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar tumores malignos o neoplasmas y otros cánceres asociados a células sanguíneas en un sujeto mamífero, tal como un ser humano, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína o la composición farmacéutica descrita en el presente documento.

Las proteínas y composiciones farmacéuticas de la invención tienen diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, utiliza en la eliminación de las células B y/o células T no deseadas, usos en la modulación de las respuestas inmunitarias para tratar enfermedades de injerto frente a huésped, usos como agentes antivirales, usos como agentes antimicrobianos y usos en la purga de tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas. Las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención son agentes comúnmente antineoplásicos, lo que significa que son capaces de tratar y/o prevenir el desarrollo, la maduración o la propagación de células neoplásicas o malignas al inhibir el crecimiento y/o causar la muerte de cáncer o células tumorales.

Una proteína o composición farmacéutica de la presente invención se puede utilizar para tratar una enfermedad o trastorno mediada por células B, células de plasma, células T o anticuerpo, tal como por ejemplo leucemia, linfoma, mieloma, enfermedades relacionados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana, amiloidosis, síndrome urémico hemolítico, poliarteritis nodosa, poliartritis, choque séptico, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriática, colitis ulcerosa, psoriasis, asma, síndrome de Sjögren, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, diabetes, vasculitis, esclerodermia y lupus eritematoso sistémico.

En otro aspecto, ciertas realizaciones de las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención son agentes antimicrobianos, lo que significa que son capaces de tratar y/o prevenir la adquisición, el desarrollo, o las consecuencias de las infecciones por patógenos microbiológicos, tales como las causadas por virus, bacterias, hongos, priones, o protozoos.

- La presente descripción proporciona una profilaxis o tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por las células B y/o células T, implicando la profilaxis o tratamiento la administración de la proteína descrita en el presente documento, o una composición farmacéutica de la misma, a un paciente en necesidad de la misma para el propósito de eliminar las células B y/o células T en el paciente. Este uso es compatible con la preparación o el acondicionamiento de un paciente para el trasplante de médula ósea, trasplante de células madre, trasplante de tejidos o trasplante de órganos, independientemente de la fuente del material trasplantado, por ejemplo, de fuentes humanas o no humanas.
- La presente descripción proporciona un receptor de médula ósea para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de huésped contra injerto a través de la eliminación de células diana de las células B huésped, células NK y/o células T usando una proteína o composición farmacéutica descrita en el presente documento (véase por ejemplo, Sarantopoulos S et al, *Biol Blood Marrow Transplant* 21: 16-23 (2015)).
- Las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar en un procedimiento de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente, en necesidad de las mismas, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína o una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente descripción, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso (tal como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico (tal como cáncer de cerebro, neurofibromatosis o glioblastoma), cáncer gastrointestinal (tal como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (tal como cánceres de ovario y cánceres testiculares, cáncer de glandular (tal como cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de la glándula salival o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza-cuello (tal como el cáncer nasofaríngeo, cáncer oral o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (tales como leucemia, linfoma o mieloma), cáncer del tracto renal-urinario (tal como el cáncer renal y cáncer de vejiga), cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura (por ejemplo, mesotelioma, carcinoma de pulmón de células pequeñas o carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata, sarcoma (tal como angiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi o sarcoma sinovial), cáncer de piel (tal como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o melanoma) y cáncer de útero.
- Las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden utilizar en un procedimiento para tratar un trastorno inmunitario que comprende la administración a un paciente, en necesidad de las mismas, de una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína o una composición farmacéutica descrita en el presente documento. En ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente descripción, el trastorno inmunitario está relacionado con una inflamación asociada a una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedades relacionadas con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa y vasculitis.
- Entre ciertas realizaciones de la presente invención, la proteína de la invención o una composición farmacéutica de la invención es para usar en el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario y/o infección microbiana. Por ejemplo, los trastornos del sistema inmunitario que se presentan en la piel de un paciente pueden tratarse con un medicamento tal en los esfuerzos para reducir la inflamación. En otro ejemplo, tumores de la piel pueden ser tratados con dicho medicamento en un esfuerzo por reducir el tamaño del tumor o eliminar el tumor por completo.
- Ciertas proteínas de la presente invención se pueden usar en aplicaciones de neurocirugía molecular, tales como el uso de inmunolesiones y rastreo neuronal (véase, Wiley R, Lappi D, *Adv Drug Deliv Rev* 55: 1043-1054 (2003), para revisión). Por ejemplo, el dominio de reconocimiento puede seleccionarse o derivarse de diversos ligandos, tales como neurotransmisores y neuropéptidos, que se dirigen a tipos de células neuronales específicas diana mediante la unión a receptores de la superficie neuronal, tales como un receptor acoplado a proteína G específico del circuito neuronal. Del mismo modo, el dominio de reconocimiento puede seleccionarse o derivarse de anticuerpos que se unen a los receptores de la superficie neuronal. Debido a que las toxinas Shiga dirigen robustamente su propio transporte axonal retrógrado, ciertas proteínas citotóxicas de la invención pueden usarse para eliminar una neurona o neuronas que expresan la diana extracelular en un sitio de la inyección de proteína citotóxica distante del cuerpo celular (ver Llewellyn-Smith I et al., *J Neurosci Methods* 103: 83-90 (2000)). Estos proteínas citotóxicas de reconocimiento específico de tipos de células neuronales tienen usos en investigación en neurociencias, tal como para elucidar los mecanismos de sensaciones (véase, por ejemplo Mishra S, Hoon M, *Science* 340: 968-71 (2013)), y la creación de sistemas de modelos de enfermedades neurodegenerativas, tales como el Parkinson y el Alzheimer (véase, por ejemplo Hamlin A et al., *PLoS One* e53472 (2013)).
- Entre ciertas realizaciones de la presente descripción está un procedimiento de uso de una proteína, composición farmacéutica y/o composición de diagnóstico descritos en este documento para detectar la presencia de un tipo de célula con el propósito de recopilación de información en relación con enfermedades, condiciones y/o trastornos. El procedimiento comprende poner en contacto una célula con una cantidad diagnósticamente suficiente de una proteína descrita en el presente documento para detectar la proteína mediante un ensayo o una técnica de

diagnóstico. El término "cantidad diagnósticamente suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona una detección adecuada y la medición precisa para fines de recogida de información por el ensayo particular o técnica de diagnóstico utilizada. Generalmente, la cantidad diagnósticamente suficiente para el uso diagnóstico *in vivo* de todo el organismo será una dosis no acumulada de entre 0,1 mg a 100 mg de la proteína unida al agente promotor de la detección por kg del sujeto por sujeto. Típicamente, la cantidad de proteína utilizada en estos procedimientos de recopilación de información será tan bajo como sea posible siempre que todavía sea una cantidad diagnósticamente suficiente. Por ejemplo, para la detección *in vivo* en un organismo, la cantidad de proteína administrada a un sujeto será tan baja como factiblemente sea posible.

El reconocimiento específico del tipo de célula de proteínas de la invención en combinación con agentes promotores de la detección proporciona una manera de detectar y obtener imágenes de células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de una región de unión de las proteínas de la invención. La obtención de imágenes de células usando las proteínas de la invención puede realizarse *in vitro* o *in vivo* mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, el procedimiento de uso de una proteína, composición farmacéutica, o composición de diagnóstico descritos en este documento para detectar la presencia de un tipo de célula con el propósito de recopilación de información se puede realizar en las células *in vivo* dentro de un paciente, incluyendo en las células *in situ*, por ejemplo, en un locus de la enfermedad, en las células *in vitro*, y/o en un entorno *ex vivo* en células y tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, un material de biopsia.

La información de diagnóstico puede ser recogida utilizando diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo formación de imágenes de todo el cuerpo de un organismo o utilizando muestras *ex vivo* tomadas de un organismo. El término muestra usado aquí se refiere a cualquier número de cosas, pero no limitado a, fluidos, tales como sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales, secreciones vaginales, y semen y tejidos obtenidos por procedimientos de biopsia. Por ejemplo, se pueden utilizar varios agentes inductores de la detección para la obtención no invasiva de imágenes de tumores *in vivo* mediante técnicas, tales como resonancia magnética (MRI), procedimientos ópticos (tales como imágenes directas, fluorescentes y bioluminiscentes), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), ultrasonidos, tomografía computarizada de rayos x y combinaciones de los anteriores (véase, Kaur S et al, Cancer Lett. 315: 97-111 (2012), para revisión).

El procedimiento descrito de la utilización de una proteína, composición farmacéutica, o composición de diagnóstico descrito en este documento para detectar la presencia de un tipo de célula positiva de la biomolécula diana con el propósito de recopilar información se puede realizar en células *in vivo* dentro de un paciente, en células *in situ*, por ejemplo, en un locus de la enfermedad, en células *in vitro*, y/o en un entorno *ex vivo* en células y tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, un material de biopsia. La detección de células específicas, tipos de células y las poblaciones de células usando una composición descrita en el presente documento se puede usar para el diagnóstico y formación de imágenes de células, tales como, por ejemplo, tumor, cáncer, células inmunes y células infectadas. Por ejemplo, las proteínas y composiciones de diagnóstico descritas en el presente documento se pueden emplear para obtener imágenes o visualizar un sitio de posible acumulación de biomolécula diana expresada por las células en un organismo. Estos procedimientos se pueden usar para identificar los sitios de desarrollo tumoral o células tumorales residuales después de una intervención terapéutica.

El procedimiento descrito utilizado para detectar la presencia de un tipo de célula puede utilizarse para reunir información con respecto a las enfermedades, trastornos y afecciones, tales como, por ejemplo cáncer de hueso (tal como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico (tal como cáncer de cerebro, neurofibromatosis o glioblastoma), cáncer gastrointestinal (tal como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (tal como cánceres de ovario y cánceres testiculares, cáncer glandular (tal como cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de la glándula salival o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza-cuello (tal como el cáncer nasofaríngeo, cáncer oral o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (tales como leucemia, linfoma o mieloma), cáncer renal-tracto urinario (tal como el cáncer renal y cáncer de vejiga), cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura (por ejemplo, mesotelioma, carcinoma de pulmón de células pequeñas o carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata, sarcoma (tal como angiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi o sarcoma sinovial), cáncer de piel (tal como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o melanoma) y cáncer de útero, el SIDA, la amiloidosis, la espondilitis anquilosante, asma, autismo, cardiogénesis, enfermedad de Crohn, diabetes, eritematoso, gastritis, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedades relacionadas con el VIH, lupus eritematoso sistémico, trastornos linfoproliferativos, esclerosis múltiple, miastenia gravis, neuroinflamación, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, vasculitis, proliferación celular, inflamación, activación de leucocitos, la adhesión de leucocitos, quimiotaxis de leucocitos, maduración de los leucocitos, migración de leucocitos, diferenciación neuronal, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica aguda/linfoma T (ALL), leucemia mielógena aguda, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), pro linfoma linfocítico de células B, linfoma de Burkitt (BL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML-BP), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma de células B grandes difusas, linfoma folicular, leucemia de células pilosas (HCL), linfoma de Hodgkin (HL), linfoma de células B grandes intravasculares, granulomatosis linfomatoide, linfoma linfoplasmacítico, linfoma

MALT, linfoma de células del manto, mieloma múltiple (MM), leucemia de células asesinas naturales, linfoma de células B nodales marginales, linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma de efusión primaria, leucemia prolinfocítica, leucemia promielocítica, linfoma linfocítico pequeño, linfoma esplénico de la zona marginal, linfoma de células T (TCL), enfermedad de cadena pesada, gammapatía monoclonal, enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal, síndromes mielodisplásicos (MDS), mieloma múltiple latente y macroglobulinemia de Waldenstrom.

Entre ciertas realizaciones de la presente descripción está un procedimiento de uso de una proteína, composición farmacéutica y/o composición de diagnóstico para marcar o detectar los interiores de las células neoplásicas y/o tipos de células inmunitarias (véase, por ejemplo, Koyama Y et al., Cancer Clin Res 13: 2936-45 (2007); Ogawa M et al, Cancer Res. 69: 1268-1272 (2009); Yang L et al, Small 5: 235-43 (2009)). Basándose en la capacidad de las proteínas y composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento para entrar en tipos de células específicas y dirigirse dentro de las células a través de transporte intracelular retrógrado, los compartimientos interiores de tipos de células específicas están marcados para la detección. Esto se puede realizar en células in situ dentro de un paciente o en las células y los tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

Las composiciones de diagnóstico de la invención pueden utilizarse para caracterizar una enfermedad, trastorno, o afección como potencialmente tratable mediante una composición farmacéutica relacionada de la invención. Ciertas composiciones de la materia descrita en este documento se pueden usar para determinar si un paciente pertenece a un grupo que responde a una estrategia terapéutica que hace uso de un compuesto, composición o procedimiento relacionado de la descripción, tal como se describe en este documento, o es adecuado para el uso de un dispositivo de administración de la descripción.

Las composiciones de diagnóstico de la invención pueden utilizarse después de detectar una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, con el fin de caracterizarla mejor, tal como para monitorizar metástasis distantes, la heterogeneidad, y la etapa de progresión del cáncer. La evaluación fenotípica de la enfermedad, trastorno o infección puede ayudar al pronóstico y predicción durante la toma de decisiones terapéuticas. En la recurrencia de la enfermedad, pueden usarse ciertos procedimientos de la descripción para determinar si el problema local o sistémica.

Las composiciones de diagnóstico de la invención pueden usarse para evaluar las respuestas a un agente o agentes terapéuticos, independientemente del tipo de fármaco terapéutico, por ejemplo, moléculas pequeñas, fármacos biológicos o terapia basada en células. Por ejemplo, ciertas formas de realización de los agentes de diagnóstico de la invención pueden ser utilizados para medir los cambios en el tamaño del tumor, los cambios en las poblaciones de células positivas de antígeno, incluyendo el número y la distribución, y/o monitorizar un marcador diferente que el antígeno dirigido por una terapia ya administrada a un paciente (véase por ejemplo Smith-Jones P et al, Nat Biotechnol 22: 701-6 (2004); Evans M et al, Proc Natl Acad Sci USA. 108: 9578-82 (2011)).

En ciertas realizaciones, las proteínas de la invención o composiciones farmacéuticas y/o de diagnóstico de las mismas se pueden usar tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, o para el diagnóstico solo.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos de proteínas selectivamente citotóxicas que comprenden regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga y regiones de unión capaces de unirse a biomoléculas diana extracelulares acopladas físicamente a tipos de células específicas.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos demuestran ciertas realizaciones de la presente divulgación. Los ejemplos se llevaron a cabo utilizando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa lo contrario en detalle.

Los siguientes ejemplos de proteínas citotóxicas demuestran la capacidad mejorada de proteínas citotóxicas de ejemplo para eliminar selectivamente las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina en comparación con sus variantes ancestrales que carecían de motivos de señal. Las proteínas citotóxicas de ejemplo se unían a biomoléculas diana expresadas por tipos de células específicas y entraban en las células diana. Las proteínas citotóxicas internalizadas dirigían eficazmente sus regiones efectoras de la toxina Shiga al citosol para inactivar los ribosomas y posteriormente causaban la muerte apoptótica de las células diana.

En primer lugar, se observó que la adición de motivos señal de la familia KDEL a múltiples proteínas de fusión basadas en la toxina Shiga reduce su citotoxicidad. Esto es coherente con la literatura científica que nunca ha descrito ningún ejemplo de construcción de toxina Shiga que se beneficie de la presencia de un motivo señal de la familia KDEL. Por tanto, se descubrió inesperadamente que la adición de un motivo señal de la familia KDEL puede mejorar la citotoxicidad basada en la toxina Shiga de ciertas construcciones. Sorprendentemente, tanto las variantes que contienen KDEL como las variantes que no contienen KDEL mostraron actividades enzimáticas similares *in vitro*,

características de unión de células similares e internalización de células similares; sin embargo, las variantes que contienen KDEL de las proteínas citotóxicas mostraron una mejor citotoxicidad. Estos resultados contradecían los hallazgos anteriores (véase, por ejemplo Jackson M et al, J Cell Sci. 112: 467-75 (1999)).

Una proteína citotóxica de ejemplo comprende una región de unión de fragmento variable de una sola cadena capaz de unirse a HER2 con alta afinidad en combinación con un fragmento de una subunidad A de toxina Shiga y un motivo KDEL carboxi-terminal. Esta proteína citotóxica de ejemplo es capaz de eliminar selectivamente células que expresan HER2 en su superficie. Una segunda proteína citotóxica de ejemplo comprende una región de fragmento variable de una sola cadena capaz de unirse a CD38 con alta afinidad en combinación con un fragmento de una subunidad A de toxina Shiga y un motivo KDEL carboxi-terminal. Esta segunda proteína citotóxica de ejemplo es capaz de eliminar selectivamente células que expresan CD38 en su superficie. Una tercera proteína citotóxica de ejemplo comprende una región de unión de fragmento variable de una sola cadena capaz de unirse a CD19 con alta afinidad en combinación con un fragmento de una subunidad A de toxina Shiga y un motivo KDEL carboxi-terminal. Esta tercera proteína citotóxica de ejemplo es capaz de eliminar selectivamente células que expresan CD19 en su superficie. Una cuarta proteína citotóxica de ejemplo comprende una región de fragmento variable de una sola cadena capaz de unirse a CD74 con alta afinidad en combinación con un fragmento de una subunidad A de toxina Shiga y un motivo KDEL carboxi-terminal. Esta cuarta proteína citotóxica de ejemplo es capaz de eliminar selectivamente células que expresan CD74 en su superficie. Otras proteínas citotóxicas de ejemplo incluyen las que tienen regiones de unión que reconocen antígenos virales de Epstein-Barr, antígenos de Leishmania, receptores de neurotensina, receptores del factor de crecimiento epidérmico, el receptor de células inmunes CCR5 y las dianas de proteínas virales env y UL18.

Ejemplo 1. Proteína citotóxica dirigida a HER2 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 con un motivo señal de retículo endoplásmico (α HER2scFv::SLT-1A::KDEL)

La proteína citotóxica de este ejemplo α HER2scFv::SLT-1A::KDEL comprende una región de unión, de fragmento variable, de cadena única capaz de unirse a HER2 con alta afinidad en combinación con un fragmento de subunidad A de toxina Shiga y un motivo KDEL carboxi-terminal.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A::KDEL

En primer lugar, se diseñaron o seleccionaron una región efectiva de la toxina Shiga y una región de unión. En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se derivó de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Se obtuvo un polinucleótido que codificaba los aminoácidos 1-251 de SLT-1A (Cheung M et al, Cancer Mol. 9: 28 (2010)). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α HER2scFv se derivó de trastuzumab (comercializado como Herceptin®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE.UU.) y el anticuerpo monoclonal 4D5 (Zhao et al, J Immunol. 183: 5563-74 (2009)), de tal manera que se crea un fragmento variable de cadena única (scFv) con las regiones variables de inmunoglobulina (V_L y V_H) separadas por un enlazador conocido en la técnica.

En segundo lugar, la región de unión y la región efectora de toxina Shiga se unieron entre sí para formar una proteína de fusión. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región de unión α HER2scFv que comprende los aminoácidos 1-245 de la SEQ ID NO: 4 se clonó en marco con un polinucleótido que codifica una "bisagra murina" derivada de una molécula de IgG3 murina (u otros enlazadores conocidos por el experto) y en marco con un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga SLT-1A que comprende los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1. En ciertos experimentos, la secuencia codificante de longitud completa de la proteína citotóxica de este ejemplo empezó con un polinucleótido que codificaba un Strep-tag® para facilitar la detección y purificación. La secuencia de polinucleótido que codifica la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A::KDEL de este ejemplo se optimizó en codones para la expresión eficaz en E. coli utilizando los servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, US).

En tercer lugar, se produjo una proteína de fusión mediante la expresión del polinucleótido que codifica la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A::KDEL (SEQ ID NO: 4). La expresión de la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se llevó a cabo utilizando los sistemas de traducción de proteínas bacterianos y libres de células.

En este ejemplo de producción de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL por un sistema de expresión de E. coli, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se clonó en el vector pTxb1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) usando procedimientos estándar para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A::KDEL ligada en marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la íntima amino-terminal del vector. La secuencia del polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.) y se transformó en células T7 Shuffle® (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La proteína α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se produjo y se purificó de acuerdo con el manual de sistema IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como usando dianas inmovilizadas de Strep-tag® o la región de unión.

En este ejemplo de producción de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL mediante un sistema de traducción de proteínas libre

de células, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se clonó en el vector pIVEX2.3 con un codón de terminación inmediatamente después de la región de codificación utilizando el kit de clonación In-Fusion® HD (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.). La proteína α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se produjo usando el sistema de traducción rápida del kit 5 Prime™ RTS 100 E. coli Disulfide (5 Prime, Gaithersburg, MD, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como usando dianas inmovilizadas de Strep-tag® o la región de unión.

10 Determinación de la unión específica máxima (B_{max}) y constante de equilibrio de unión (K_D) de los tipos de células diana de unión a α HER2scFv::SLT-1A::KDEL

Las características de unión de la proteína α HER2scFv::SLT-1A::KDEL producida como se describe anteriormente se determinaron mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia. Las muestras que contienen células HER2 positivas (+) y células HER2 negativas (-) se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (1X PBS) (Hyclone Brand, Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) que contenía un 1 por ciento de albúmina de suero bovino (BSA) (Calbiochem, San Diego, CA, EE.UU.), en lo sucesivo denominado "1X PBS + 1% de BSA" y se incubaron durante 1 hora a 4 grados Celsius (°C) con 100 μ l de diversas diluciones de la proteína α HER2scFv::SLT-1A::KDEL a ensayar. Las mayores concentraciones de proteína α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se seleccionaron para dar lugar a la saturación de la reacción de unión. Después de la incubación de una hora, las muestras de células se lavaron dos veces con 1X PBS + 1% de BSA. Las muestras de células se incubaron durante 1 hora a 4°C con 100 μ l de 1X PBS + 1% BSA que contenía 0,3 μ g de mA b anti-Strep-tag® -FITC (# A01736-100, Genscript, Piscataway, NJ, EE.UU.).

Las muestras celulares se lavaron a continuación dos veces con 1X PBS + 1% BSA, se resuspendieron en 200 μ l de 1X PBS y se sometieron a citometría de flujo basada en fluorescencia. Los datos de intensidad de fluorescencia media (MFI) para todas las muestras se obtuvieron regulando los datos utilizando una única muestra de FITC como control negativo. Los gráficos se representaron de MFI frente a "la concentración de las células", utilizando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Utilizando la función de software Prism de unión de un sitio $[Y = B_{max} * X / (K_D + X)]$ bajo el encabezamiento de unión de saturación, se calcularon la B_{max} y K_D utilizando datos corregidos con la línea base. Los valores Abs se corrigieron para la base restando los valores Abs medidos para los pocillos que contenían solamente PBS. B_{max} es la unión específica máxima descrita en MFI. K_D es la constante de unión en equilibrio expresada en nanomolar (nM).

La B_{max} para la unión de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL a células HER2+ se midió que era aproximadamente 110.000 MFI con una K_D de aproximadamente 160 nM (Tabla 1). Este resultado fue relativamente similar a la B_{max} para la unión de la proteína α HER2scFv::SLT-1A, que carecía de un motivo señal KDEL, a células HER2+ que se midió que era aproximadamente 140.000 MFI con una K_D de aproximadamente 180 nM (Tabla 1). Se observó que ninguna proteína tenía una unión medible a células negativas de HER2 en este ensayo. Esto demuestra que la citotoxicidad mejorada de la variante KDEL, probablemente, no está relacionada con un cambio en las propiedades de unión celular de la diana del dominio derivado de inmunoglobulina.

Tabla 1. La adición de KDEL no tuvo efecto significativo en las características de unión: Los valores representativos para B_{max} y K_D para α HER2scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal de KDEL

Proteína citotóxica	Biomolécula diana	células diana positivas	
		B _{max} (MFI)	K _D (nM)
α HER2scFv::SLT-1A::KDEL	HER2	111.000	158
α HER2scFv::SLT-1A	HER2	141.000	182

50 Determinación de la concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL para ribosomas de eucariotas *in vitro*

La capacidad de inactivación de ribosomas de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se determinó en un ensayo de traducción de proteínas libre de células, *in vitro*, utilizando el kit de transcripción/traducción TNT® Quick Coupled (L1170 Promega, Madison, WI, US). El kit incluye ADN de control T7 luciferasa y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad de ribosoma se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

Una serie de diluciones de 10 veces de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL a ensayar se preparó en tampón apropiado y se crearon una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL. Cada muestra en la serie de dilución de la proteína α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control de T7 luciferasa. Las muestras de ensayo se

incubaron durante 1,5 horas a 30°C. Después de la incubación, se añadió de reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE.UU.) a todas las muestras de prueba y se midió la cantidad de traducción de la proteína luciferasa mediante luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición de la traducción se determinó por análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó la concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) para cada muestra. A continuación, los datos se normalizaron mediante el cálculo del "porcentaje de proteína de control de SLT-1A sola" usando la función de software Prism de log (inhibidor) vs. respuesta (tres parámetros) [$Y = \text{Inferior} + ((\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{-(X - \text{Log IC}_{50})}))$] bajo el título de inhibición dosis-respuesta. Se calculó la IC₅₀ para las proteínas experimentales y proteína de control SLT-1A. El porcentaje de proteína de control SLT-1A sola se calculó mediante $[(IC_{50} \text{ de proteína de control SLT-1A} / IC_{50} \text{ de proteína experimental}) \times 100]$.

El efecto inhibidor de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la IC₅₀ de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células fue de aproximadamente 70 picomolar (pM) o dentro del 6% del control positivo sólo con SLT-1A (Tabla 2). Este resultado no fue sustancialmente diferente de la IC₅₀ para la proteína α HER2scFv::SLT-1A que carecía de un motivo señal de KDEL, que se midió que estaba dentro de 8% del control positivo que sólo contenía SLT-1A (Tabla 2). Esto demuestra que la citotoxicidad mejorada de la variante KDEL no está probablemente relacionada con un cambio en la actividad enzimática de la subunidad A de la toxina Shiga.

Tabla 2. La adición de KDEL no tuvo efecto significativo en la inactivación de ribosomas: Concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) para α HER2scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal KDEL

Proteína citotóxica	IC ₅₀ (pM)	IC ₅₀ de SLT-1A sola control positivo (pM)	Porcentaje de IC ₅₀ de la proteína de control SLT-1A
α HER2scFv::SLT-1A::KDEL	69,0	73,0	106%
α HER2scFv::SLT-1A	28,1	30,4	108%

Determinación de la citotoxicidad selectiva y la Concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se determinó mediante el siguiente ensayo de eliminación celular. Este ensayo determina la capacidad de una proteína citotóxica para eliminar las células que expresan la biomolécula diana de la región de unión de la proteína citotóxica en comparación con células que no expresan la biomolécula diana. Las células se sembraron (2×10^3 células por pocillo) en 20 μ l de medio de cultivo celular en placas de 384 pocillos. La proteína α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se diluyó 5 veces o 10 veces en IX PBS y se añadieron 5 μ l de las diluciones a las células. Los pocillos de control que contenían sólo medio de cultivo celular se utilizaron para la corrección de la línea base. Las muestras de células se incubaron con α HER2scFv::SLT-1A::KDEL, o simplemente tampón, durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). La supervivencia total de las células o porcentaje de viabilidad se determinó utilizando una lectura luminiscente utilizando el ensayo de viabilidad CellTiter-Glo® Luminescent Cell (G7573 Promega Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación: $(RLU \text{ de prueba} - RLU \text{ media promedio}) / (RLU \text{ de células promedio} - RLU \text{ media promedio}) \times 100$. La concentración de polipéptido en forma log frente al porcentaje de viabilidad se representó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.) y se utilizó el análisis de log (inhibidor) vs. respuesta normalizada (pendiente variable) para determinar el valor de concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para α HER2scFv::SLT-1A::KDEL.

Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la CD₅₀ de la proteína α HER2scFv::SLT-1A::KDEL se midió que era aproximadamente de 0,001 a 0,13 nM para células HER2+ en comparación con 14-37 nM para células HER2-, dependiendo de la línea celular (Tabla 3; Figura 2). La CD₅₀ de α HER2scFv::SLT-1A::KDEL fue más de 100 veces mayor para las células no acopladas físicamente con la biomolécula diana extracelular HER2 en comparación con células que se acoplaron físicamente con la biomolécula diana extracelular HER2, por ejemplo, HER2 expresado en sus superficies celulares (Tabla 3; Figura 2).

Tabla 3. Adición de citotoxicidad mejorada con KDEL: concentraciones citotóxicas semimáxima (CD₅₀) para α HER2scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal de KDEL

Línea celular	Estado de HER2	CD ₅₀ (nM)		
		α HER2scFv::SLT-1A::KDEL	α HER2scFv::SLT-1A	SLT-1A sola control negativo
HCC-1954	positivo	0,1100	2,1	320
SKBR3	positivo	0,1300	1,3	220

BT474	positivo	0,0010	1,6	14
MDA-MB-231	negativo	37,0000	1500,0	130
MDA-MB-468	negativo	14,0000	546,0	230

La CD₅₀ de la variante α HER2scFv::SLT-1A que carecía de un motivo señal de KDEL carboxi terminal se midió que era de aproximadamente 1,3 a 2,1 nM para células HER2+ (Tabla 3; Figura 2). Por lo tanto, la adición de un motivo señal de KDEL redujo la CD₅₀ a las células HER2+ en 10-20 veces. Además, α HER2scFv::SLT-1A::KDEL eliminó más células totales que α HER2scFv::SLT-1A, tal como se ve en la disminución de la viabilidad celular a la concentración más alta ensayada (Figura 2). Estos resultados ejemplifican el efecto de la adición de un motivo señal de KDEL tanto en la citotoxicidad como en la citotoxicidad selectiva. Las diferencias en la eliminación celular por estas proteínas citotóxicas no eran predecibles en base a los resultados *in vitro* para la inhibición de la síntesis de proteínas o las características de unión a célula diana.

Determinación de la internalización celular de α HER2scFv::SLT-1A con y sin un motivo señal de KDEL utilizando inmunofluorescencia

La capacidad de las proteínas citotóxicas para entrar en las células diana se investigó usando técnicas inmunocitoquímicas estándar conocidas en el sector. Brevemente, se recogieron $0,8 \times 10^6$ células de cada tipo de célula (SKBR3 (HER2 +) y MDA-MB-231 (HER2)) y se suspendieron en 50 μ l de medio de cultivo celular que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa (por ejemplo, P1860 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y la proteína del receptor Fc humano para reducir la tinción de inmunofluorescencia no específica. A continuación, se añadió 100 nM de la proteína citotóxica a analizar a las células, y las células se incubaron a 37°C durante 1 hora para permitir el progreso de la intoxicación. A continuación, las células se "fijaron" y "permeabilizaron" usando el Kit de Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences San Diego, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La región efectora de la toxina Shiga se "tiñó" utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG de ratón anti-subunidad A de toxina Shiga 1, BEI NR-867 BEI Reorigens, Manassas, VA, EE.UU.). A continuación, se detectó la localización del anticuerpo monoclonal de ratón con el kit Alexa Fluor® 555 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

En este ensayo, se observó la internalización celular en células HER2+ para α HER2scFv::SLT-1A::KDEL y la variante α HER2scFv::SLT-1A que carecía de un motivo señal KDEL (Figura 3). No se observó internalización celular para ninguna proteína a células HER2. Esto demuestra que las diferencias en la citotoxicidad (Tabla 3; Figura 2) entre la variante de KDEL y la variante ancestral entre estas dos variantes probablemente no están relacionadas con ningún cambio significativo en la unión a células dianas y/o entrada celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A en células neoplásicas HER2+. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan HER2 en sus superficies celulares.

Ejemplo 2. Proteína citotóxica dirigida a CD38 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 con un motivo señal de retículo endoplásmico carboxi-terminal (α CD38scFv::SLT-1A::KDEL)

La proteína citotóxica de este ejemplo α CD38scFv::SLT-1A::KDEL comprende una región de unión de fragmento variable de una sola cadena capaz de unirse a CD38 con alta afinidad en combinación con un fragmento de la subunidad A de la toxina Shiga y un motivo KDEL carboxi-terminal.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica α CD38scFv::SLT-1A::KDEL

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se derivó de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Se obtuvo un polinucleótido que codificaba los aminoácidos 1-251 de SLT-1A (Cheung M et al, Mol Cancer. 9: 28 (2010)). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α CD38scFv derivó del anticuerpo monoclonal anti-CD38 HB7 (Peng et al, Blood 101: 2557-62 (2003); véase también GenBank Acceso BD376144, Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE.UU.) de tal manera que se crea un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) con las dos regiones variables de inmunoglobulina (V_L y V_H) separadas por un enlazador conocido en la técnica.

En este ejemplo, la región de unión y la región efectora de toxina Shiga se unieron entre sí para formar una proteína de fusión. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región de unión α CD38scFv que comprende los aminoácidos 1-241 de la SEQ ID NO: 8 se clonó en marco con un polinucleótido que codifica una "bisagra murina" derivada de una molécula de IgG3 murina (u otros enlazadores conocidos por el experto) y en marco con un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga SLT-1A que comprende los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1. En ciertos experimentos, la secuencia codificante de longitud completa de la proteína citotóxica de este ejemplo empezó con un polinucleótido que codifica un Strep-tag® para facilitar la detección y purificación. La

secuencia de polinucleótido que codifica la proteína citotóxica α CD38scFv::SLT-1A::KDEL de este ejemplo se optimizó por codones para la expresión eficaz en *E. coli* utilizando los servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, US).

- 5 Se produce una proteína de fusión mediante la expresión del polinucleótido que codifica la proteína citotóxica α CD38scFv::SLT-1A::KDEL (SEQ ID NO: 8). LA expresión de la proteína citotóxica α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se llevó a cabo utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y libres de células.

10 En este ejemplo de producción de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL por un sistema de expresión de *E. coli*, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se clonó en el vector pTxb1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) usando procedimientos estándar para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica α CD38scFv::SLT-1A::KDEL ligada en marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la interna amino-terminal del vector. La secuencia del polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.) y se transformó en células T7 Shuffle® (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La proteína α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se produjo y se purificó de acuerdo con el manual de sistema IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como usando dianas inmovilizadas de Strep-tag® o la región de unión.

20 En este ejemplo de producción de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL mediante un sistema de traducción de proteínas libre de células, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se clonó en el vector pIVEX2.3 con un codón de terminación inmediatamente después de la región de codificación utilizando el kit de clonación In-Fusion® HD (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.). La proteína α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se produjo usando el sistema de traducción rápida del kit 5 Prime™ RTS 100 *E. coli* Disulfide (5 Prime, Gaithersburg, MD, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como usando dianas inmovilizadas de Strep-tag® o la región de unión.

- 30 La determinación de la unión específica máxima (B_{max}) y constante de equilibrio de unión (K_D) de los tipos de células diana de unión a α CD38scFv::SLT-1A::KDEL

Las características de unión de la proteína α CD38scFv::SLT-1A::KDEL producida como se describe anteriormente se determinaron mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia. Las muestras que contienen células CD38 positivas (+) y células CD38 negativas (-) se suspendieron en 1X PBS + 1% de BSA y se incubaron durante 1 hora a 4°C con 100 μ l de diversas diluciones de la proteína α CD38scFv::SLT-1A::KDEL a ensayar. Las mayores concentraciones de proteína α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se seleccionaron para dar lugar a la saturación de la reacción de unión. Después de la incubación de una hora, las muestras de células se lavaron dos veces con 1X PBS + 1% de BSA. Las muestras de células se incubaron durante 1 hora a 4°C con 100 μ l de 1X PBS + 1% BSA que contenía 0,3 μ g de mAb anti-Strep-tag® -FITC (# A01736-100, Genscript, Piscataway, NJ, EE.UU.).

Las muestras celulares se lavaron a continuación dos veces con 1X PBS + 1% BSA, se resuspendieron en 200 μ l de 1X PBS y se sometieron a citometría de flujo basada en fluorescencia. Los datos de intensidad de fluorescencia media (MFI) para todas las muestras se obtuvieron regulando los datos utilizando una única muestra de FITC como control negativo. Los gráficos se representaron de MFI frente a "la concentración de las células", utilizando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Utilizando la función de software Prism de unión de un sitio [$Y = B_{max} * X / (K_D + X)$] bajo el encabezamiento de unión de saturación, se calcularon la B_{max} y K_D utilizando datos corregidos con la línea base. Los valores Abs se corrigieron para la base restando los valores Abs medidos para los pocillos que contenían solamente PBS. B_{max} es la unión específica máxima descrita en MFI. K_D es la constante de unión en equilibrio expresada en nM.

La B_{max} para la unión de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL a células CD38+ se midió que era aproximadamente 100.000 MFI con una K_D de aproximadamente 13 nM (Tabla 4). Este resultado fue relativamente similar a la B_{max} para la unión de la proteína α CD38scFv::SLT-1A, que carecía de un motivo señal KDEL, a células CD38+ que se midió que era aproximadamente 110.000 MFI con una K_D de aproximadamente 17 nM (Tabla 4). Ninguna proteína se unió a células CD38-. Esto demuestra que la citotoxicidad mejorada de la variante KDEL, probablemente, no está relacionada con un cambio en las propiedades de unión celular de la diana del dominio derivado de inmunoglobulina.

- 60 **Tabla 4. La adición de KDEL no tuvo efecto sobre las características de unión:** Los valores representativos para B_{max} y K_D para α CD38scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal de KDEL

Proteína citotóxica	Biomolécula diana	células diana positivas	
		B_{max} (MFI)	K_D (nM)
α CD38scFv::SLT-	CD38	102.000	12,5

1A::KDEL			
α CD38scFv::SLT-1A	CD38	108.000	17,0

Determinación de la concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL para ribosomas eucariotas *in vitro*

5 La capacidad de inactivación de ribosomas de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se determinó en un ensayo de traducción de proteínas libre de células, *in vitro*, utilizando el kit de transcripción/traducción TNT® Quick Coupled (L1170 Promega, Madison, WI, US). El kit incluye ADN de control T7 luciferasa y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad de ribosoma se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

10 Una serie de diluciones de 10 veces de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL a ensayar se preparó en tampón apropiado y se crearon una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL. Cada muestra en la serie de dilución de la proteína α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control de T7 luciferasa. Las muestras de ensayo se incubaron durante 1,5 horas a 30°C. Después de la incubación, se añadió de reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE.UU.) a todas las muestras de prueba y se midió la cantidad de traducción de la proteína luciferasa mediante luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición de la traducción se determinó por análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó la concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) para cada muestra. A continuación, los datos se normalizaron mediante el cálculo del "porcentaje de proteína de control de SLT-1A sola" usando la función de software Prism de log (inhibidor) vs. respuesta (tres parámetros) [$Y = \text{Inferior} + ((\text{superior} - \text{inferior}) / (1 + 10^{-(X - \text{Log IC}_{50})}))$] bajo el título de inhibición dosis-respuesta. Se calculó la IC₅₀ para las proteínas experimentales y proteína de control SLT-1A. El porcentaje de proteína de control SLT-1A sola se calculó mediante $[(IC_{50} \text{ de proteína de control SLT-1A} / IC_{50} \text{ de proteína experimental}) \times 100]$.

El efecto inhibidor de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la IC₅₀ de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células fue de aproximadamente 15 pM o de 99% del control positivo sólo con SLT-1A (Tabla 5). Este resultado fue similar a la IC₅₀ para la proteína α CD38scFv::SLT-1A que carecía de un motivo señal de KDEL, que se midió que era de 15 pM o 101% del control positivo que sólo contenía SLT-1A (Tabla 5). Esto demuestra que la citotoxicidad mejorada de la variante que comprende KDEL no está relacionada con un cambio significativo en la actividad enzimática de la subunidad A de la toxina Shiga.

35 **Tabla 5. Adición de KDEL no tuvo efecto sobre la inactivación de ribosomas:** Concentración inhibidora semimáxima representativa (IC₅₀) para α CD38scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con su predecesor, que carecía de un motivo señal de KDEL

Proteína citotóxica	IC ₅₀ (pM)	IC ₅₀ de SLT-1A sola control positivo (pM)	Porcentaje de IC ₅₀ de la proteína de control SLT-1A
α CD38scFv::SLT-1A::KDEL	15,1	15,0	99%
α CD38scFv::SLT-1A	14,8	15,0	101%

40 Determinación de la citotoxicidad selectiva y concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se determinaron mediante el siguiente ensayo de eliminación celular. Este ensayo determina la capacidad de una proteína citotóxica para eliminar células que expresan la biomolécula diana de la región de unión de la proteína citotóxica en comparación con células que no expresan la biomolécula diana. Las células se sembraron (2×10^3 células por pocillo) en 20 μ l de medio de cultivo celular en placas de 384 pocillos. La proteína α CD38scFv::SLT-1A::KDEL se diluyó 5 veces o 10 veces en un IX PBS y se añadieron 5 μ l de las diluciones a las células. Los pocillos de control que contenían sólo medio de cultivo celular se utilizaron para la corrección de la línea base. Las muestras de células se incubaron con α CD38scFv::SLT-1A::KDEL, o simplemente tampón, durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂. La supervivencia de las células o porcentaje de viabilidad total se determinó utilizando una lectura luminiscente utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7573 Promega Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación: $(RLU \text{ de ensayo} - RLU \text{ de medio promedio}) / (RLU \text{ de células promedio} - RLU \text{ de medio promedio}) \times 100$. La concentración de polipéptido en log frente al porcentaje de viabilidad se representó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.) y el análisis de log (inhibidor) vs. respuesta normalizada (pendiente variable) se utilizó para determinar el valor de concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para α CD38scFv::SLT-1A::KDEL.

La CD_{50} de la proteína $\alpha CD38scFv::SLT-1A::KDEL$ se midió que era aproximadamente 0,2-1 nM para las células $CD38+$, dependiendo de la línea celular, en comparación con 300 nM para una línea celular $CD38-$, que era relativamente similar a la CD_{50} para el control negativo sólo con SLT-1A (Tabla 6; Figura 4). La CD_{50} de la $\alpha CD38scFv::SLT-1A::KDEL$ fue aproximadamente 300-2000 veces mayor para las células no acopladas físicamente con la biomolécula diana extracelular $CD38$ en comparación con células que se acoplaron físicamente con la biomolécula diana extracelular $CD38$, por ejemplo, $CD38$ expresada en su superficie celular.

Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la CD_{50} para la $\alpha CD38scFv::SLT-1A$, que carecía de un motivo señal $KDEL$, fue de aproximadamente 0,8-3,2 nM (Tabla 6; Figura 4), que era 2-4 veces mayor (menos citotóxicos) que la misma proteína con un motivo señal $KDEL$ carboxi-terminal. Esto ejemplifica el efecto de la adición de un motivo señal $KDEL$ en la citotoxicidad y la citotoxicidad selectiva. Las diferencias en la eliminación celular para estas proteínas citotóxicas no eran predecibles en base a los resultados *in vitro* para las características de inactivación de ribosomas o de unión a células diana.

Tabla 6. Adición de citotoxicidad mejorada con KDEL: concentraciones citotóxicas semimáximas representativas (CD_{50}) para $\alpha CD38scFv::SLT-1A::KDEL$ en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal de $KDEL$

Línea celular	Estado $CD38$	CD_{50} (nM)		
		$\alpha CD38scFv::SLT-1A::KDEL$	$\alpha CD38scFv::SLT-1A$	SLT-1A sólo control negativo
Daudi	positivo	0,32	1,10	750
Raji	positivo	0,98	3,20	1.100
ST486	positivo	0,18	0,75	940
BC-1	positivo	0,59	1,10	510
U226	negativo	300,00	670,00	490

Determinación de la internalización celular de SLT-1A:: $\alpha CD38scFv$ mediante inmunofluorescencia

La capacidad de $\alpha CD38scFv::SLT-1$, el antecesor de $\alpha CD38scFv::SLT-1::KDEL$ que carecía de un motivo señal $KDEL$, para entrar en las células diana se investigó usando técnicas inmunocitoquímicas estándar conocidas en la técnica. Brevemente, se recogieron $0,8 \times 10^6$ células de cada tipo celular (Raji ($CD38+$), Daudi ($CD38+$), y U266 ($CD38-$)) y se suspendieron en 50 μ l de medio de cultivo celular que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas (por ejemplo, P1860 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.) y la proteína del receptor Fc humano para reducir la tinción de inmunofluorescencia no específica. A continuación, se añadió 100 nM de la proteína citotóxica a analizar a las células y las células se incubaron a 37°C durante 1 hora para permitir el progreso de la intoxicación. A continuación, las células se "fijaron" y "permeabilizaron" usando el Kit de Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences San Diego, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La región efectora de la toxina Shiga se "tiñó" utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG de ratón anti-subunidad A de toxina Shiga 1, BEI NR-867 BEI Reorigens, Manassas, VA, EE.UU.). A continuación, se detectó la localización del anticuerpo monoclonal de ratón con el kit Alexa Fluor® 555 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

En este ensayo, se observó la unión a la superficie celular y la internalización celular en células $CD38+$ para $\alpha CD38scFv::SLT-1$. No se observó internalización celular para ninguna proteína a células $CD38-$. Esto demuestra que las diferencias en la citotoxicidad (Tabla 6; Figura 4) entre la variante de $KDEL$ de la proteína citotóxica y su antecesor probablemente no están causadas por cambio significativos en la capacidad de $\alpha CD38scFv::SLT-1$ para unirse a células dianas e internalizarse.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica $\alpha CD38scFv::SLT-1::KDEL$ utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica $\alpha CD38scFv::SLT-1A::KDEL$ en células neoplásicas y/o inmunes. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas y/o células inmunes humanas que expresan $CD38$ en sus superficies celulares.

Ejemplo 3. Proteína citotóxica dirigida a $CD19$ derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 ($\alpha CD19scFv::SLT-1A::KDEL$)

La proteína citotóxica de este ejemplo $\alpha CD19scFv::SLT-1A::KDEL$ comprende una región de unión, de una sola cadena, variable capaz de unir a $CD19$ con alta afinidad en combinación con un fragmento de la subunidad A de la toxina Shiga y un motivo $KDEL$ carboxi-terminal.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica α CD19scFv::SLT-1A::KDEL

En primer lugar, se diseñaron o seleccionaron una región efectiva de la toxina Shiga y una región de unión. En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se derivó de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Se obtuvo un polinucleótido que codificaba los aminoácidos 1-251 de SLT-1A (Cheung M et al, Cancer Mol. 9: 28 (2010)). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α CD19scFv se derivó del anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD19 4G7 (Peipp M et al. J Immunol Methods 285: 265-80 (2004) y las referencias en la misma), de tal manera que se crea un fragmento variable de cadena única (scFv) con las dos regiones variables de inmunoglobulina (V_L y V_H) separadas por un enlazador conocido en la técnica.

En segundo lugar, la región de unión y la región efectora de toxina Shiga se unieron entre sí para formar una proteína de fusión. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región de unión α CD19scFv que comprende los aminoácidos 1-250 de la SEQ ID NO: 12 se clonó en marco con un polinucleótido que codifica un enlazador, tal como una "bisagra murina" derivada de una molécula de IgG3 murina (u otros enlazadores conocidos por el experto) y en marco con un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga SLT-1A (aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1) fusionada a un motivo KDEL carboxi-terminal. La secuencia de polinucleótido que codifica la proteína citotóxica α CD19scFv::SLT-1A::KDEL de este ejemplo se optimizó en codones para la expresión eficaz en *E. coli* utilizando los servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, US).

Se produjo una proteína de fusión mediante la expresión del polinucleótido que codifica la proteína citotóxica α CD19scFv::SLT-1A::KDEL (SEQ ID NO: 12). La expresión de la proteína citotóxica α CD19scFv::SLT-1A::KDEL se llevó a cabo utilizando un sistema bacteriano conocido en la técnica.

En este ejemplo de producción de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL por un sistema de expresión de *E. coli*, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica α CD19scFv::SLT-1A::KDEL se clonó en el vector pTxb1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) usando procedimientos estándar para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica α CD19scFv::SLT-1A::KDEL ligada en marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína amino-terminal del vector. La secuencia del polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.) y se transformó en células T7 Shuffle® (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La proteína α CD19scFv::SLT-1A::KDEL se produjo y se purificó de acuerdo con el manual de sistema IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como cromatografía de afinidad.

Determinación de la concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL para ribosomas de eucariotas *in vitro*

La capacidad de inactivación de ribosomas de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL se determinó en un ensayo de traducción de proteínas libre de células, *in vitro*, utilizando el kit de transcripción/traducción TNT® Quick Coupled (L1170 Promega, Madison, WI, US). El kit incluye ADN de control T7 luciferasa y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad de ribosoma se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

Una serie de diluciones de 10 veces de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL a ensayar se preparó en tampón apropiado y se crearon una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL. Cada muestra en la serie de dilución de la proteína α CD19scFv::SLT-1A::KDEL se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control de T7 luciferasa. Las muestras de ensayo se incubaron durante 1,5 horas a 30°C. Después de la incubación, se añadió de reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE.UU.) a todas las muestras de prueba y se midió la cantidad de traducción de la proteína luciferasa mediante luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición de la traducción se determinó por análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó la concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) para cada muestra.

El efecto inhibitor de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la IC_{50} de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células fue de aproximadamente 2,7 pM (Tabla 7). Este resultado no fue sustancialmente diferente de la IC_{50} para la proteína α CD19scFv::SLT-1A que carecía de un motivo señal de KDEL, que se midió que era de aproximadamente 3,2 pM o equivalente de la que sólo contenía SLT-1A (Tabla 7). Esto demuestra que la citotoxicidad mejorada de la variante KDEL no está probablemente relacionada con un cambio significativo en la actividad enzimática de la subunidad A de la toxina Shiga.

Tabla 7. Adición de KDEL no tuvo efecto sobre la inactivación de ribosomas: Concentración inhibidora semimáxima representativa (IC_{50}) para α CD19scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal de KDEL

Proteína citotóxica	IC ₅₀ (pM)	IC ₅₀ de SLT-1A sola control positivo (pM)
α CD19scFv::SLT-1A::KDEL	2,7	7,9
α CD19scFv::SLT-1A	3,2	7,9

Determinación de la citotoxicidad selectiva y concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL se determinaron mediante el siguiente ensayo de eliminación celular. Este ensayo determina la capacidad de una proteína citotóxica para eliminar las células que expresan la biomolécula diana de su región de unión de tipo inmunoglobulina, en comparación con la proteína SLT-1A que no posee la región de unión. Las células se sembraron (2 x 10³ células por pocillo) en 20 μ l de medio de cultivo celular en placas de 384 pocillos. La proteína α CD19scFv::SLT-1A::KDEL se diluyó 10 veces en tampón y se añadieron 5 μ l de las diluciones a las células. Los pocillos de control que contenían sólo medio de cultivo celular se utilizaron para la corrección de la línea base. Las muestras de células se incubaron con α CD19scFv::SLT-1A::KDEL, o simplemente tampón, durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂. La supervivencia de las células o porcentaje de viabilidad total se determinó utilizando una lectura luminiscente utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7573 Promega Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación: (RLU de ensayo – RLU de medio promedio)/(RLU de células promedio – RU de medio promedio) * 100. La concentración de polipéptido en log frente al porcentaje de viabilidad se representó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.) y el análisis de log (inhibidor) vs. respuesta normalizada (pendiente variable) se utilizó para determinar el valor de concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para α CD38scFv::SLT-1A::KDEL.

Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la CD₅₀ de la proteína α CD19scFv::SLT-1A::KDEL era aproximadamente 0,15 nM para las células CD19+ Daudi (Tabla 8, Figura 5). Las CD₅₀ para el control negativo con sólo SLT-1A y de la misma proteína que carece del motivo KDEL, α CD19scFv::SLT-1A, no pudieron ser medidas con precisión en base a la forma de la curva. Estos resultados ejemplifican el efecto de la adición de un motivo señal KDEL en la citotoxicidad y la citotoxicidad selectiva (Tabla 8, Figura 5). Las diferencias en la eliminación celular para estas proteínas citotóxicas no eran predecibles en base a los resultados *in vitro* para la inhibición de la síntesis de proteínas y no se espera que sean predecibles basándose en las características de unión a célula diana.

Tabla 8. El motivo KDEL afectó a la citotoxicidad: concentraciones citotóxicas semimáximas representativas (CD₅₀) de α CD19scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con α CD19scFv::SLT-1A

Línea celular	Estado de CD19	CD ₅₀ (nM)		
		α CD19scFv::SLT-1A::KDEL	α CD19scFv::SLT-1A	SLT-1A sola control negativo
Daudi	positivo	0,15	NC	NC

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α CD19scFv::TR-1A::KDEL utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α CD19scFv::SLT-1A::KDEL en células neoplásicas y/o inmunes. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas y/o células inmunes humanas que expresan CD19 en sus superficies celulares.

Ejemplo 4. Proteína citotóxica dirigida a CD74 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga-1 (α CD74scFv::SLT-1A::KDEL)

Una cuarta proteína citotóxica de ejemplo comprende un fragmento de la subunidad A de la toxina Shiga recombinado con una sola región de unión, de una sola cadena, variable capaz de unir a CD74 con alta afinidad. Esta cuarta proteína citotóxica de ejemplo es capaz de eliminar selectivamente células que expresan CD74 en su superficie.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica α CD74scFv::SLT-1A::KDEL

En primer lugar, se diseñaron o seleccionaron una región efectiva de la toxina Shiga y una región de unión. En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se derivó de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Se obtuvo un polinucleótido que codificaba los aminoácidos 1-251 de SLT-1A (Cheung M et al, Cancer Mol. 9: 28 (2010)). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α CD74scFv se derivó del anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD74 Milatuzumab (Sapra P et al. Clin Cancer Res 11: 5257-64 (2005) y las referencias en la misma), de tal manera que se crea un fragmento variable de cadena única (scFv) con las dos regiones variables de

inmunoglobulina (V_L y V_H) separadas por un enlazador conocido en la técnica.

En segundo lugar, la región de unión y la región efectora de toxina Shiga se unieron entre sí para formar una proteína de fusión. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región de unión α CD74scFv que comprende los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 16 se clonó en marco con un polinucleótido que codifica un enlazador, tal como una "bisagra murina" derivada de una molécula de IgG3 murina (u otros enlazadores conocidos por el experto) y en marco con un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga SLT-1A (aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1) fusionada a un motivo KDEL carboxi-terminal. La secuencia de polinucleótido que codifica la proteína citotóxica α CD74scFv::SLT-1A::KDEL de este ejemplo se optimizó en codones para la expresión eficaz en *E. coli* utilizando los servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, US).

Se produjo una proteína de fusión mediante la expresión del polinucleótido que codifica la proteína citotóxica α CD74scFv::SLT-1A::KDEL (SEQ ID NO: 16). La expresión de la proteína citotóxica α CD74scFv::SLT-1A::KDEL se llevó a cabo utilizando un sistema bacteriano conocido en la técnica.

En este ejemplo de producción de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL por un sistema de expresión de *E. coli*, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica α CD74scFv::SLT-1A::KDEL se clonó en el vector pTxb1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) usando procedimientos estándar para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica α CD74scFv::SLT-1A::KDEL ligada en marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la región amino-terminal del vector. La secuencia del polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.) y se transformó en células T7 Shuffle® (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La proteína α CD74scFv::SLT-1A::KDEL se produjo y se purificó de acuerdo con el manual de sistema IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como cromatografía de afinidad.

Determinación de la concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL para ribosomas de eucariotas *in vitro*

La capacidad de inactivación de ribosomas de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL se determinó en un ensayo de traducción de proteínas libre de células, *in vitro*, utilizando el kit de transcripción/traducción TNT® Quick Coupled (L1170 Promega, Madison, WI, US). El kit incluye ADN de control T7 luciferasa y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad de ribosoma se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

Una serie de diluciones de 10 veces de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL a ensayar se preparó en tampón apropiado y se crearon una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL. Cada muestra en la serie de dilución de la proteína α CD74scFv::SLT-1A::KDEL se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control de T7 luciferasa. Las muestras de ensayo se incubaron durante 1,5 horas a 30°C. Después de la incubación, se añadió de reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE.UU.) a todas las muestras de prueba y se midió la cantidad de traducción de la proteína luciferasa mediante luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición de la traducción se determinó por análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó la concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) para cada muestra.

El efecto inhibitor de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la IC_{50} de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células fue de aproximadamente 3,1 pM (Tabla 9). Este resultado no fue sustancialmente diferente de la IC_{50} para la proteína α CD74scFv::SLT-1A que carecía de un motivo señal de KDEL, que se midió que era aproximadamente 3,6 pM o equivalente del control positivo que sólo contenía SLT-1A (Tabla 9).

Tabla 9. El motivo KDEL no tuvo efecto sobre la inactivación de ribosomas: concentraciones inhibidoras semimáximas representativas (IC_{50}) para α CD74scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con α CD74scFv::SLT-1A

Proteína citotóxica	IC_{50} (pM)	IC_{50} de SLT-1A sola control positivo (pM)
α CD74scFv::SLT-1A::KDEL	3,1	7,9
α CD74scFv::SLT-1 ^a	3,6	7,9

Determinación de la citotoxicidad selectiva y Concentración citotóxica semimáxima (CD_{50}) de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL se determinaron mediante el siguiente ensayo de eliminación celular. Este ensayo determina la capacidad de una proteína citotóxica para eliminar las células que

expresan la biomolécula diana de su región de unión de tipo inmunoglobulina, en comparación con la proteína SLT-1A que no posee la región de unión. Las células se sembraron (2×10^3 células por pocillo) en 20 μ l de medio de cultivo celular en placas de 384 pocillos. La proteína α CD74scFv::SLT-1A::KDEL se diluyó 10 veces en tampón y se añadieron 5 μ l de las diluciones a las células. Los pocillos de control que contenían sólo medio de cultivo celular se utilizaron para la corrección de la línea base. Las muestras de células se incubaron con α CD74scFv::SLT-1A::KDEL, o simplemente tampón, durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de 5% de CO₂. La supervivencia de las células o porcentaje de viabilidad total se determinó utilizando una lectura luminiscente utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7573 Promega Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación: $(\text{RLU de ensayo} - \text{RLU de medio promedio}) / (\text{RLU de células promedio} - \text{RU de medio promedio}) \times 100$. La concentración de polipéptido en log frente al porcentaje de viabilidad se representó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.) y el análisis de log (inhibidor) vs. respuesta normalizada (pendiente variable) se utilizó para determinar el valor de concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para α CD38scFv::SLT-1A::KDEL.

Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la CD₅₀ de la proteína α CD74scFv::SLT-1A::KDEL era aproximadamente 29,9 nM para las células CD74+ Daudi (Tabla 10, Figura 6). Las CD₅₀ para el control negativo con sólo SLT-1A fue de 2026 nM y de la misma proteína que carece del motivo KDEL, α CD74scFv::SLT-1A, fue de 95,3 nM (tabla 10, figura 6). Estos resultados ejemplifican el efecto de la adición de un motivo señal KDEL en la citotoxicidad y la citotoxicidad selectiva. Las diferencias en la eliminación celular para estas proteínas citotóxicas no eran predecibles en base a los resultados *in vitro* para la inhibición de la síntesis de proteínas y no se espera que sean predecibles basándose en las características de unión a célula diana.

Tabla 10. El motivo KDEL afectó a la citotoxicidad: concentraciones citotóxicas semimáximas representativas (CD₅₀) de α CD74scFv::SLT-1A::KDEL en comparación con α CD74scFv::SLT-1A

Línea celular	Estado de CD74	CD ₅₀ (nM)		
		α CD74scFv::SLT-1A::KDEL	α CD74scFv::SLT-1A	SLT-1A sola control negativo
Daudi	positivo	29,97	95,3	2026

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α CD74scFv::TR-1A::KDEL utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α CD74scFv::SLT-1A::KDEL en células neoplásicas y/o inmunes. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas y/o células inmunes humanas que expresan CD74 en sus superficies celulares.

Ejemplo 5. Proteína citotóxica dirigida a HER2 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (α HER2scFv::SLT-1A::RDEL)

En este ejemplo, se creó y analizó α HER2scFv::SLT-1A::RDEL como en el Ejemplo 1, excepto por el carboxi-terminal terminado con la secuencia del péptido RDEL en lugar de KDEL. Las características de unión celular de la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A::RDEL se determinaron mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia como se describe en el Ejemplo 1. La Bmax para la proteína citotóxica α HER2scFv::SLT-1A::RDEL se midió que era de aproximadamente 130.000 MFI con una K_D de aproximadamente 167 nM, mientras que no se observó una unión significativa a células HER2- en este ensayo. El efecto inhibitorio de α HER2scFv::SLT-1A::RDEL en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte, tal como se muestra por la medición de una IC₅₀ para α HER2scFv::SLT-1A::RDEL en la síntesis de proteínas de aproximadamente 36 pM.

Las características de citotoxicidad de α HER2scFv::SLT-1A::RDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células HER2+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de α HER2scFv::SLT-1A::RDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células HER2- como una comparación con las células HER2+. La CD₅₀ de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células HER2+ dependiendo de la línea celular. La CD₅₀ de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan HER2 en una superficie celular en comparación con células que expresan HER2 en una superficie celular

Ejemplo 6. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo α Epstein-Barr-antígeno

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α Epstein-Barr-antígeno deriva de un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de Epstein Barr (Fang C et al, Immunol Methods J 287: 21-30 (2004)), que comprende una región

de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a una célula humana infectada por el virus de Epstein-Barr o una célula transformada que expresa un antígeno de Epstein-Barr. El antígeno de Epstein-Barr se expresa en varios tipos de células, tales como células infectadas por un virus de Epstein-Barr y células del cáncer (por ejemplo, células de linfoma y de cáncer de nasofaringeo). Además, la infección por Epstein-Barr se asocia con otras enfermedades, por ejemplo, esclerosis múltiple.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina α Epstein-Barr-antígeno y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade KDEL carboxi-terminal para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a α EpsteinBarr-antígeno α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células positivas de antígeno de Epstein-Barr y células negativas de antígeno de Epstein-Barr se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La Bmax para α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL a células positivas de antígeno de Epstein-Barr se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de antígeno de Epstein-Barr en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EpsteinBarr::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de antígeno de Epstein-Barr. Además, las características de citotoxicidad selectiva de α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de antígeno de Epstein-Barr como una comparación con las células positivas de antígeno de Epstein-Barr. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de antígeno de Epstein-Barr, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan el antígeno de Epstein-Barr en una superficie celular, en comparación con células que expresan el antígeno de Epstein-Barr en una superficie celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α EpsteinBarr::SLT-1A::KDEL en células neoplásicas. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan antígenos de Epstein-Barr en sus superficies celulares.

Ejemplo 7. Proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo α Leishmania-antígeno

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α Leishmania-antígeno deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, a un antígeno de Leishmania de la superficie celular presente en las células humanas que albergan protozoos tripanosomátidos intracelulares (véase Berman J, Dwyer, Clin Exp Immunol 44: 342-348 (1981); Kenner J et al, J Cutan Pathol 26: 130-6 (1999); Silveira T et al, Int J Parasitol. 31: 1451-8 (2001)).

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina α Leishmania-antígeno y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade KDEL carboxi-terminal para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a α Leishmania-antígeno SLT-

1A:: α Leishmania::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

5 Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células positivas de antígeno de Leishmania y células negativas de antígeno de Leishmania se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La Bmax para SLT-1A:: α Leishmania::KDEL a células positivas de antígeno de Leishmania se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de antígeno de Leishmania en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α Leishmania::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

20 Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de antígeno de Leishmania. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de antígeno de Leishmania como una comparación con las células positivas de antígeno de Leishmania. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de antígeno de Leishmania, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan el antígeno de Leishmania en una superficie celular, en comparación con células que expresan el antígeno de Leishmania en una superficie celular.

35 **Ejemplo 8. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y la región de unión de tipo inmunoglobulina α Neurotensina-Receptor**

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α Neurotensina-Receptor deriva de DARPin™ (GenBank Acceso: 2P2C_R) o un anticuerpo monoclonal (Ovigne J et al, Neuropeptides 32: 247-56 (1998)) que se une al receptor de neurotensina humana. El receptor de neurotensina es expresado por varias células cancerosas, tales como células de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.

40 Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinR::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina α NeurotensinR y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade KDEL carboxi-terminal para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión al receptor de neurotensina SLT-1A:: α NeurotensinR::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinR::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

50 Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinR::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células positivas de receptor de neurotensina y células negativas de receptor de neurotensina se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La Bmax para SLT-1A:: α NeurotensinR::KDEL a células positivas de receptor de neurotensina se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de receptor de neurotensina en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinR::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α NeurotensinR::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

65 Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinR::KDEL utilizando un ensayo de

eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de receptor de neurotensina. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de receptor de neurotensina como una comparación con las células positivas de receptor de neurotensina. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de receptor de neurotensina, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan el receptor de neurotensina en una superficie celular, en comparación con células que expresan el receptor de neurotensina en una superficie celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL en células neoplásicas. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan receptores de neurotensina en sus superficies celulares.

Ejemplo 9. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y una región de unión de tipo inmunoglobulina α EGFR

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). La región de unión α EGFR deriva de AdNectin™ (GenBank acceso: 3QWQ_B), Affibody™ (GenBank acceso: 2KZI_A; patente de EE.UU. 8.598.113), o un anticuerpo, todos ellos se unen a uno o más receptores del factor de crecimiento epidérmico humano. La expresión de los receptores del factor de crecimiento epidérmico se asocian con células de cáncer humanas, tales como, por ejemplo, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de mama y células de cáncer de colon.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina α EGFR y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade KDEL carboxi-terminal para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a EGFR SLT-1A:: α EGFR::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células EGFR+ y células EGFR- se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B_{max} para SLT-1A:: α EGFR::KDEL a células EGFR+ se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células EGFR- en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibidor de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α EGFR::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α EGFR::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células EGFR+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A:: α EGFR::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células EGFR- como una comparación con las células positivas de antígeno de Leishmania. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células EGFR+, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan EGFR en una superficie celular, en comparación con células que expresan EGFR en una superficie celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A::αEGFR::KDEL en células neoplásicas. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan EGFR (s) en sus superficies celulares.

Ejemplo 10. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo αCCR5

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina αCCR5 deriva de un anticuerpo monoclonal contra CCR5 humano (CD195) (Bernstone L et al, Hybridoma 31: 7-19 (2012)). CCR5 se expresa predominantemente en las células T, macrófagos, células dendríticas y microglia. Además, CCR5 juega un papel en la patogénesis y la propagación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina αCCR5 y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade KDEL carboxi-terminal para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a αCCR5 SLT-1A::αCCR5::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células CCR5+ y células CCR5- se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B_{max} para SLT-1A::αCCR5::KDEL a células CCR5+ se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células CCR5- en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC₅₀ de SLT-1A::αCCR5::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αCCR5::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células CCR5+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A::αCCR5::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células CCR5- como una comparación con las células CCR5+. La CD₅₀ de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células CCR5+, dependiendo de la línea celular. La CD₅₀ de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan CCR5 en una superficie celular, en comparación con células que expresan CCR5 en una superficie celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL en el agotamiento de células T de materiales donantes (ver Tsirigotis P et al, Immunotherapy 4: 407-24 (2012)). Los primates no humanos se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de SLT-1A::αCCR5. La enfermedad de injerto contra huésped se analiza en macacos rhesus después del trasplante renal cuando los órganos donados se tratan previamente con SLT-1A::αCCR5::KDEL (véase Weaver T et al, Nat Med. 15: 746-9 (2009)). Se observa agotamiento *in vivo* de linfocitos T de sangre periférica en primates cynomolgus después de la administración parenteral de diferentes dosis de SLT-1A::αCCR5::KDEL. El uso de SLT-1A::αCCR5::KDEL para bloquear la infección por VIH se prueba administrando una dosis aguda de SLT-1A::αCCR5::KDEL a primates no humanos con el fin de agotar severamente las células T circulantes tras la exposición a un virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) (ver Sellier P et al, PLoS One 5: e10570 (2010)).

Ejemplo 11. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina Shiga y un dominio de inmunoglobulina anti-Env

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina Shiga (Stx-A). Una

región de unión de tipo inmunoglobulina α Env deriva de anticuerpos existentes que se unen a la glicoproteína de la cubierta del VIH (Env), tales como GP41, GP120, GP140 o GP160 (véase, por ejemplo Chen W et al, J Mol Bio 382: 779-89 (2008); Chen W et al, Expert Opin Biol Ther 13: 657-71 (2013); van den Kerkhof T et al, Retrovirology 10: 102 (2013) o de anticuerpos generados usando técnicas estándar (véase Prabakaran et al, Frente Microbiol 3: 277 (2012)). Env son proteínas de superficie del VIH que también se expresan en las superficies celulares de las células infectadas por el VIH durante la replicación del VIH. Aunque las Env se expresan en las células infectadas predominantemente en compartimientos endosomales, cantidades suficientes de Env podría estar presentes en una superficie celular a reconocer por una proteína citotóxica muy potente. Además, las proteínas citotóxicas que reconocen las Env podrían unirse a viriones de VIH y entrar en las células recién infectadas durante la fusión de viriones con una célula huésped.

Dado que el VIH muestra una alta tasa de mutación, es preferible utilizar un dominio de inmunoglobulina que se una a una parte constreñida funcional de una Env, tal como se muestra mediante la amplia neutralización de anticuerpos que se unen a Env a partir de múltiples cepas del VIH (van den Kerkhof T et al., Retrovirology 10: 102 (2013)). Debido a que se cree que las Env presentes en la superficie de una célula infectada presentan epítopos estéricamente restringidos (Chen W et al, J Virol. 88: 1125-1139 (2014), es preferible utilizar regiones de unión más pequeñas de 100 kD e idealmente menores que 25 kD, tales como fragmentos de sdAbs como dominios V_HH .

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica α Env::SLT-1A::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina α Env y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade KDEL carboxi-terminal para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a α Env SLT-1A:: α Env::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α ENV::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células Env+ y células Env- se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La Bmax para SLT-1A:: α Env::KDEL a células positivas Env+ se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células Env- en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibidor de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α Env::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α Env::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células Env+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A:: α Env::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células Env- como una comparación con las células Env+. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células Env+, dependiendo de la línea celular y/o la cepa de VIH utilizada para infectar las células para hacerlas Env+. La CD_{50} de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan Env en una superficie celular, en comparación con células que expresan Env en una superficie celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL utilizando modelos animales

El uso de SLT-1A:: α Env::KDEL para inhibir la infección por VIH se prueba mediante la administración de SLT-1A:: α Env::KDEL a primates no humanos infectados con el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) (ver Sellier P et al., PLoS Un 5: e10570 (2010)).

Ejemplo 12. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo α UL18

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α UL18 deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, para la proteína de citomegalovirus de superficie celular UL18, que está presente en las células humanas infectadas con citomegalovirus (Yang Z, Bjorkman P, Proc Natl Acad Sci USA. 105: 10095-100 (2008)). La infección por citomegalovirus humano se asocia con varios tipos de cáncer y trastornos inflamatorios.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A::αUL18::KDEL

5 La región de unión de tipo inmunoglobulina αUL18 y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade KDEL carboxi-terminal para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a αUL18 SLT-1A:: αUL18::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A::αUL18::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

10 Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A::αUL18::KDEL

15 Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células positivas de la proteína de citomegalovirus UL18 y células negativas de la proteína de citomegalovirus UL18 se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B_{max} para SLT-1A::αUL18::KDEL a células positivas de proteína de citomegalovirus UL18 se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de proteína de citomegalovirus UL18 en este ensayo.

20 La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::αUL18::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC₅₀ de SLT-1A::αUL18::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

25 Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A::αUL18::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

30 Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αUL18::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de la proteína de citomegalovirus UL18. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A::αUL18::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de proteína de citomegalovirus UL18 como una comparación con las células positivas de proteína de citomegalovirus UL18. La CD₅₀ de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de la proteína de citomegalovirus UL18, dependiendo de la línea celular. La CD₅₀ de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan la proteína de citomegalovirus UL18 en una superficie celular, en comparación con células que expresan la proteína de citomegalovirus UL18 en una superficie celular.

40 **Ejemplo 13. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo antígeno intestinal de helminto**

45 En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina αantígeno intestinal de helminto deriva de un anticuerpo generado, usando técnicas conocidas en la técnica, para el ortólogo de helmintos de un receptor de transferrina humana (véase, por ejemplo el gen de nematodos GCP-2,1 UniProt G8JYE4_CAEEL; Rosa B et al, Mol Cell Proteómica M114.046227 (2015)).

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica αAntígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL

50 La región de unión de tipo inmunoglobulina αantígeno intestinal de helminto y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade KDEL carboxi-terminal para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a αantígeno intestinal de helminto αantígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica αantígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica αantígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL

60 Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo se determinan mediante un ensayo de unión molecular conocido en la técnica utilizando una proteína diana recombinante purificada. La K_D para αantígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL a la proteína diana se mide que es aproximadamente de 100 nM, mientras que no hay unión significativa a una proteína de control negativa (por ejemplo, receptor de transferrina humana recombinante, purificada) en este ensayo.

65 La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica αantígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los

ejemplos anteriores. El efecto inhibitor de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC₅₀ de antígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

5 Determinación de la toxicidad de la proteína citotóxica αAntígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL usando Helmintos

10 La toxicidad de antígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL a helmintos se determina usando helmintos modelo (véase, por ejemplo Iatsenko I et al., Toxins 2050-63 (2014)). El helminto se puede administrar antígeno intestinal de helminto purificado::SLT-1A::KDEL mediante remojo o, alternativamente, mediante la alimentación del helminto con bacterias que expresan la proteína de fusión SLT-1A::antígeno intestinal de helminto.

15 Además, los animales de laboratorio que alberga helmintos y/o presentan enfermedades relacionadas con helmintos se administran con antígeno intestinal de helminto::SLT-1A::KDEL y se controlan para la reducción o eliminación de helmintos y/o síntomas asociados de helmintos parasitarios.

Ejemplo 14. Proteínas citotóxicas dirigidos a diversos tipos de células

20 En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A), toxina Shiga (stxA), y/o toxina semejante a Shiga 2 (SLT-2A). Una región de unión deriva de las moléculas elegidas de la columna 1 de la Tabla 11 y que se une a la biomolécula diana extracelular indicada en la columna 2 de la Tabla 11. Las proteínas de ejemplo de este ejemplo se crean con un motivo señal de tipo KDEL carboxi-terminal usando técnicas conocidas en la técnica y, opcionalmente, unidas con un agente o agentes promotores de la detección. Las proteínas de ejemplo de este ejemplo se ensayaron tal como se describe en los ejemplos anteriores utilizando células que expresan las biomoléculas diana extracelulares apropiadas. Las proteínas de ejemplo de este ejemplo se pueden usar, por ejemplo, para el marcaje de los compartimentos subcelulares de las células diana y para diagnosticar y tratar enfermedades, afecciones y/o trastornos indicados en la columna 3 de la Tabla 11.

30 **Tabla 11. Varias regiones de unión para el reconocimiento celular de proteína citotóxicas**

Origen de la región de unión	Diana extracelular	Aplicación o aplicaciones
alemtuzumab	CD52	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
basiliximab	CD25	trastornos de células T, tales como la prevención de rechazos de trasplante de órganos y algunos cánceres del linaje de células B
brentuximab	CD30	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
catumaxomab	EpCAM	varios cánceres, tales como cáncer de ovario, ascitis maligna, cáncer gástrico
cetuximab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorrectal y de cabeza y cuello
daclizumab	CD25	cánceres de linaje de células B y trastornos de células T, tales como el rechazo de trasplante de órganos
daratumumab	CD38	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
dinutuximab	gangliósido GD2	Varios cánceres, tales como cáncer de mama, cánceres mieloides y neuroblastoma
efalizumab	LFA-1 (CD11a)	trastornos autoinmunes, tales como psoriasis
ertumaxomab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
gemtuzumab	CD33	cáncer mielóide o trastorno inmunitario
ibritumomab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ipilimumab	CD152	trastornos relacionados con células T y varios cánceres, tales como leucemia, melanoma
muromonab	CD3	prevención de los rechazos de trasplante de órganos
natalizumab	integrina α4	trastornos autoinmunes, tales como esclerosis

		múltiple y enfermedad de Crohn
obinutuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ocaratuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ocrelizumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ofatumumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
palivizumab	Proteína F del virus sincitial respiratorio	tratar el virus sincitial respiratorio
panitumumab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y cáncer de cabeza y cuello
pertuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
pro 140	CCR5	infección por VIH y trastornos de células T
ramucirumab	VEGFR2	varios cánceres y trastornos relacionados con cáncer, tales como tumores sólidos
rituximab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
tocilizumab o atlizumab	receptor de IL-6	trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide
tositumomab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
trastuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
ublituximab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
vedolizumab	integrina $\alpha 4\beta 7$	trastornos autoinmunes, tales como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa
anticuerpos de unión y scFv de CD20	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes (véase, por ejemplo, Geng S et al. Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006); Olafsen T et al. Protein Eng Des Sel 23: 243-9 (2010))
scFv de unión a CD22	CD22	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B (véase, por ejemplo, Kawas S et al. MAbs s: 479-86 (2011))
scFv de unión a CD25	CD25	varios cánceres de linaje de células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T (véase, por ejemplo, Muramatsu H et al., Cancer Lett 225: 225-36 (2005))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD30	CD30	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B/células T (véase, por ejemplo, Klimka A et al., Br J Cancer 83: 252-60 (2000))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD33	CD33	cáncer mielóide o trastorno inmunitario (véase, por ejemplo, Benedict C et al., J Immunol Methods 201: 223-31 (1997))
dominios de inmunoglobulina de unión a CD38	CD38	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos 8,153,765)
scFv de unión a CD40	CD40	varios cánceres y trastornos inmunitarios (véase, por ejemplo, Ellmark P et al., Immunology 106: 456-63 (2002))

anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD52	CD52	Cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos 7,910,104 B2)
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD56	CD56	trastornos inmunitarios y varios cánceres, tales como cáncer de pulmón, Merkel cell carcinoma, mieloma (véase, por ejemplo, Shin J et al., Hybridoma 18: 521-7 (1999))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD79	CD79	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B (véase, por ejemplo, Zhang L et al. Ther. Immunol. 2: 191-202 (1995))
anticuerpos monoclonales de unión y scFv de unión a CD133	CD133	varios cánceres, tumores hematológicos y trastornos inmunitarios (véase, por ejemplo, Bidlingmaier S et al., J Mol Med 86: 1025-32 (2008); Pavlon L et al., J Microsc 231: 374-83 (2008); Rappa G et al., Stem Cells 26: 3008-17 (2008); Swaminathan S et al., J Immunol Methods 361: 110-5 (2010); Wang J et al., Hybridoma 29: 241-9 (2010); Zhu X et al., Mol Cancer Ther 9: 2131-41 (2010); Xia J et al., Sci Rep 3: 3320 (2013))
scFv de unión a CD248	CD248	varios cánceres, tales como angiogénesis inhibidora (véase, por ejemplo, Zhao A et al., J Immunol Methods 363: 221-32 (2011))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a EpCAM	EpCAM	varios cánceres, tales como cáncer de ovario, ascitos malignos, cáncer gástrico (véase, por ejemplo, Schanzer J et al., J Immunother 29: 477-88 (2006))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a PSMA	PSMA	cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Frigerio B et al., Eur J Cancer 49: 2223-32 (2013))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a Eph-B2	Eph-B2	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Abéngozar M et al., Blood 119: 4565-76 (2012))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a endoglina	Endoglina	varios cánceres, tales como cáncer de mama y cánceres colorectales (véase, por ejemplo, Völkel T et al., Biochim Biophys Res Acta 1663: 158-66 (2004))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a FAP	FAP	varios cánceres, tales como sarcomas y cánceres de hueso (véase, por ejemplo, Zhang J et al., FASEB J 27: 581-9 (2013))
anticuerpo o anticuerpos y scFv de unión a CEA	CEA	varios cánceres, tales como cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón y cáncer de mama (véase, por ejemplo, Neumaier M et al., Cancer Res 50: 2128-34 (1990); Pavoni E et al., BMC Cancer 6: 4 (2006); Yazaki P et al., Nucl Med Biol 35: 151-8 (2008); Zhao J et al., Oncol Res 17: 217-22 (2008))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD24	CD24	varios cánceres, tales como bladder cancer (véase, por ejemplo, Kristiansen G et al., Lab Invest 90: 1102-16 (2010))
scFv de unión a antígenos de Lewis Y	antígenos de Lewis Y	varios cánceres, tales como cáncer de cuello de útero y cáncer uterino (véase, por ejemplo, Power B et al., Protein Sci 12: 734-47 (2003); monoclonal antibody BR96 Feridani A et al., Cytometry 71: 361-70 (2007))
adalimumab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis en placas, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, enfermedad hemolítica del recién nacido
afelimomab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios
ald518	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
anrukinzumab o ima-638	IL-13	varios cánceres y trastornos inmunitarios

briakinumab	IL-12, IL-23	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como psoriasis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino, esclerosis múltiple
brodalumab	IL-17	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedades inflamatorias
canakinumab	IL-1	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
certolizumab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedad de Crohn
fezakinumab	IL-22	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, psoriasis
ganitumab	IGF-I	varios cánceres
golimumab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante
infliximab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriática, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa
ixekizumab	IL-17A	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedades autoinmunes
mepolizumab	IL-5	varios trastornos inmunitarios y cánceres, tales como cánceres de células B
nerelimomab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios
olokizumab	IL6	varios cánceres y trastornos inmunitarios
ozoralizumab	TNF- α	inflamación
perakizumab	IL17A	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis
placulumab	TNF humano	varios trastornos inmunitarios y cánceres
sarilumab	IL6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante
siltuximab	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios,
sirukumab	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
tabalumab	BAFF	cánceres de células B
ticilimumab o tremelimumab	CTLA-4	varios cánceres
tildrakizumab	IL23	trastornos inflamatorios mediados inmunológicamente
tnx-650	IL-13	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como cánceres de células B
tocilizumab o atlizumab	receptor de IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
ustekinumab	IL-12, IL-23	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como esclerosis múltiple, psoriasis, artritis psoriática
Varios factores de crecimiento: VEGF, EGF1, EGF2, FGF	VEGFR, EGFR, FGFR	varios cánceres, tales como cáncer de mama y cáncer de colon, y para inhibir la vascularización
Varias citoquinas: IL-2, IL-6, IL-23, CCL2, BAFFs, TNFs, RANKL	IL-2R, IL-6R, IL23R, CD80/CD86, TNFRSF13/TNFRSF17, TNFR	varios trastornos inmunitarios y cánceres
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígeno de la superficie de la gripe (por ejemplo, hemaglutininas y proteína de matriz 2)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012))
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígenos de la superficie de coronavirus	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012))
Varios anticuerpos	Antígenos de la superficie de filovirus (por ejemplo VP35, VP40 y glicoproteína)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Olinger G et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 109: 18030-5 (2012); Pettitt J et al., Sci Transl Med 5: 199ra113 (2013); Stahelin R, Expert Opin Ther Targets 18: 115-20 (2014); Becquart P et al., PLoS One 9:

		e96360 (2014); Stahelin R, Fron Microbiol 5: 300 (2014); Tran E et al., J Virol 88: 10958-62 (2014); Murin C et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 111: 17182-7 (2014))
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígenos de la superficie de la de henipavirus	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012))
Varios anticuerpos que incluyen anticuerpos ampliamente neutralizantes y scFv	Antígenos de la superficie de VIH (por ejemplo, proteína de matriz Map 17)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Kitidee K et al., BMC Biotechnol 10: 80 (2010); Yu L, Guan Y, Front Immunol 5: 250 (2014))
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígenos de la superficie de gripe (por ejemplo, hemaglutininas y proteína de matriz 2)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012))

5

La presente invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. Aunque algunas realizaciones de la presente invención se han descrito a modo de ilustración, será evidente que la invención puede ser puesta en práctica con muchas modificaciones, variaciones y adaptaciones, y con el uso de numerosos equivalentes o soluciones alternativas que están dentro del alcance de las personas expertas en la técnica.

Listado de secuencias		
Número ID	Descripción del texto	Secuencia biológica
SEQ ID NO: 1	Subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNL FAVDVRGIDPEEGRFNNRLRIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS HSGTSLTQSVARAMLRFTVTAE ALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASRVARMASDEFPSMCP ADGRVRGITHNKILWDSSTLGAIL MRRTISS
SEQ ID NO: 2	Subunidad A de la toxina Shiga	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDN LFAVDVRGIDPEEGRFNNRLRIVE RNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLM SHSGTSLTQSVARAMLRFTVTAE EALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSY VMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDY HGQDSVRVGRISFGSINAILGSVA LILNCHHHASRVARMASDEFPSM CPADGRVRGITHNKILWDSSTLGA ILMRRTISS

SEQ ID NO: 3	Subunidad A de la toxina semejante a Shiga 2 (SLT-2A)	DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAIS TPLGNISQGGVSVSVINHVLGGNY ISLNVRLDPYSERFNHLRLIMER NNLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIADL ERTGMQIGRHSLVGSYLDLMEFR GRSMTRASSRAMLRFTVIAEAL RFRQIQRGFRPALSEASPLYTMTA QDVDLTLNWGRISNVLPYRGEE GVRIGRISFNSLSAILGSVAVILNC HSTGSYSVRSVSQKQKTECQIVGD RAAIKVNNVLWEANTIAALLNRK PQDLTEPNQ
SEQ ID NO: 4	α HER2scFv::SLT-1A::KDEL variante 1	MDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKP GSGEGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDV WGQGTLVTVSSEFPKPSTPPGSSG GAPKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIR SAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFA DFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTL QRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSGTSLTQSVARAMLRFTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGR SYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLP DYHGQDSVRVGRISFGSINAILGS VALILNCHHHASRVARKDEL

SEQ ID NO: 5	α HER2scFv::SLT-1A::KDEL variante 2	MDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKP GSGEGSEVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDV WGQGT LVTVSSEFPKPSTPPGSSG GAPGILGFVFTLKEFTLDFSTAKT YVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTS LLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPEE GRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINR HSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVAR AMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT TLDDL SGRSYVMTAEDVDLT LN WGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRIS FGSINAILGSVALILNCHHHASRV ARKDEL
SEQ ID NO: 6	α HER2scFv::SLT-1A::KDEL variante 3	MDIQMTQSPSSLSASVGDRVITC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTD FTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKP GSGEGSEVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDV WGQGT LVTVSSEFPKPSTPPGSSG GAPKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIR SAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI VERNNLYVTGFVNRNTNNVFYRFA DFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTL QRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDL SGR SYVMTAEDVDLT LNWGR LSSVLP DYHGQDSVRVGRISFGSINAILGS VALILNCHHHASRVARKDEL

SEQ ID NO: 7	α HER2scFv::SLT-1A::KDEL variante 4	MDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTD FTLTISLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGKP GSGEGSEVQLVESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAP GKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDV WGQGTLLTVSSEFPKPSTPPGSSG GAPGILGFVFTLKEFTLDFSTAKT YVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTS LLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPEE GRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINR HSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVAR AMLRFTVTAEALRFRQIQRGFRT TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRIS FGSINAILGSVALILNCHHHASRV ARKDEL
SEQ ID NO: 8	α CD38scFv::SLT-1A::KDEL variante 1	MDIELTQSPSSFVSLSGDRVITICK ASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLL ISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDY TSLTSLQTEDVATYYCQQYWSTP TFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGE GSKVQLQESGPSLVQPSQRLSITC TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWRGGSTDYNAAFMSRLSI TKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAI YFCAKTLITTGYAMDYWGQGT VTVSSEFPKPSTPPGSSGGAPKEFT LDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPL QTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAV DVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNL YVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVT FPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSG TSLTQSVARAMLRFTVTAEALR FRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTA EDVDLTNLWGRLLSSVLPDYHGQD SVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASRVARKDEL

SEQ ID NO: 9	α CD38scFv::SLT-1A::KDEL variante 2	MDIELTQSPSSFSVSLGDRVITITCK ASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLL ISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDY TLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTP TFGGGKLEIKGSTSGSGKPGSGE GSKVQLQESGPSLVQPSQRLSITC TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWRGGSTDYNAAFMSRLSI TKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAI YFCAKTLITTGYAMDYWGQGT VTVSSEFPKPSTPPGSSGGAPGILG FVFTLKEFTLDFSTAKTYVDSLNV IRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGS GDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSY LDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFV TVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL GRSYVMATAEDVDLTNLWGRLLSS VLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAI LGSVALILNCHHHASRVARKDEL
SEQ ID NO: 10	α CD38scFv::SLT-1A::KDEL variante 3	MDIELTQSPSSFSVSLGDRVITITCK ASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLL ISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDY TLSITSLQTEDVATYYCQQYWSTP TFGGGKLEIKGSTSGSGKPGSGE GSKVQLQESGPSLVQPSQRLSITC TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWRGGSTDYNAAFMSRLSI TKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAI YFCAKTLITTGYAMDYWGQGT VTVSSEFPKPSTPPGSSGGAPKEFT LDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPL QTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAV DVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVT FPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSG TSLTQSVARAMLRFVTVTAEALR FRQIQRGFRTTLDDLSSGRSYVMATA EDVDLTNLWGRLLSSVLPDYHGQD SVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASRVARKDEL

SEQ ID NO: 11	α CD38scFv::SLT-1A::KDEL variante 4	MDIELTQSPSSFVSLSGDRVITITCK ASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRL ISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDY TSLITSLQTEDVATYYCQQYWSTP TFGGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGE GSKVQLQESGPSLVQPSQRLSITC TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKGLE WLGVIWRGGSTDYNAAFMSRLSI TKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAI YFCAKTLITTGYAMDYWGQGT VTVSSEFPKPSTPPGSSGGAPGILG FVFTLKEFTLDFSTAKTYVDSLNV IRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGS GDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSY LDLMSHSGTSLTQSVARAMLRV TVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL GRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSS VLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAI LGSVALILNCHHHASRVARKDEL
SEQ ID NO: 12	α CD19scFv::SLT-1A::KDEL variante 1	MDIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCR SSKSLNLSNGNTYLYWFLQRPQG SPQLLIYRMSNLA SGVPDRFSGSG SGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPTFTGAGTKLELKGSTSGS GKPGSGEGSEVQLQQSGPELIKPG ASVKMSCKASGYTFTSYVMHWV KQKPGQGLEWIGYINPYNDGTTY NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMEL SSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSR VFDYWGQGTTLTVSSAEFPKPSTP PGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDS LNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFN NLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNV FYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDS SYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSI NAILGSVALILNCHHHASRVARK DEL

SEQ ID NO: 13	α CD19scFv::SLT-1A::KDEL variante 2	MDIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCR SSKSLLNSNGNTYLYWFLQRPQG SPQLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSG SGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPFTFGAGTKLELKGSTSGS GKPGSGEGSEVQLQQSGPELIKPG ASVKMSCKASGYTFTSYVMHWV KQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKY NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMEL SSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSR VFDYWGQGTTLTVSSAEFPKPSTP PGSSGGAPGILGFVFTLKEFTLDFS TAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISS GGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGI DPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTT AVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGM QINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQ SVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQ RGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVD LTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVARKDEL
SEQ ID NO: 14	α CD19scFv::SLT-1A::KDEL variante 3	MDIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCR SSKSLLNSNGNTYLYWFLQRPQG SPQLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSG SGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCM QHLEYPFTFGAGTKLELKGSTSGS GKPGSGEGSEVQLQQSGPELIKPG ASVKMSCKASGYTFTSYVMHWV KQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKY NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMEL SSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSR VFDYWGQGTTLTVSSAEFPKPSTP PGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDS LNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFN NLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNV FYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDS SYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSI NAILGSVALILNCHHHASRVARK DEL

SEQ ID NO: 15	α CD19scFv::SLT-1A::KDEL variante 4	MDIVMTQAAPSIPVTPGESVSISCR SSKSLNSNGNTYLYWFLQRPQG SPQLLIYRMSNLAGVDPDRFSGSG SGTAFTLRISRVEAEDVGYYCM QHLEYPFTFGAGTKLELKGSTSGS GKPGSGEGSEVQLQQSGPELIKPG ASVKMSCKASGYTFTSYVMHWV KQKPGQGLEWIGYINPYNDGTKY NEKFKGKATLTSDKSSSTAYMEL SSLTSEDSAVYYCARGTYYYGSR VFDYWGQGTTTLTVSSAEFPKPSTP PGSSGGAPGILGFVFTLKEFTLDFS TAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISS GGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGI DPEEGRFNNRLLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTT AVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGM QINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQ SVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQ RGFRTTLDLSDGRSYVMTAEDVD LTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVARKDEL
SEQ ID NO: 16	α CD74scFv::SLT-1A::KDEL variante 1	MDIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCR SSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQ SPRLLIYTVSNRFSGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGYYFCSQS SHVPPTFGAGTRLEIKGSTSGSGK PGSGEGSTKGQVQLQQSGSELKK PGASVKVSCCKASGYTFTNYGVN WIKQAPGQGLQWMGWNPNTGE PTFDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYL QISSLKADDTAVYFCSRSGKNEA WFAYWGQGLTVTSSEFPKPSTP PGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDS LNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFN NLRLLIVERNNLYVTGFVNRTNNV FYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDS SYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSDGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSI NAILGSVALILNCHHHASRVARK DEL

SEQ ID NO: 17	α CD74scFv::SLT-1A::KDEL variante 2	MDIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCR SSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQ SPRLLIYTVSNRFSGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQS SHVPPTFGAGTRLEIKGSTSGSGK PGSGEGSTKGQVQLQQSGSELKK PGASVKVSCKASGYTFTNYGVN WIKQAPGQGLQWMGWINPNTGE PTFDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYL QISSLKADDTAVYFCRSRSGKNEA WFAYWGQGLTVTSSEFPKPSTP PGSSGGAPGILGFVFTLKEFTLDFS TAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISS GGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGI DPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFHVTFPGTT AVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGM QINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQ SVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQ RGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVD LTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVARKDEL
---------------	---	--

SEQ ID NO: 18	α CD74scFv::SLT-1A::KDEL variante 3	MDIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCR SSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPGQ SPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQS SHVPPTFGAGTRLEIKGSTSGSGK PGSGEGSTKGQVQLQQSGSELKK PGASVKVSCKASGYTFTNYGVN WIKQAPGQGLQWMGWINPNTGE PTFDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYL QISSLKADDTAVYFCRSRSGKNEA WFAYWGQGTLLTVSSEFPKPSTP PGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDS LNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFN NLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNV FYRFADFHVTFPGTTAVTLSGDS SYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSI NAILGSVALILNCHHHASRVARK DEL
---------------	---	--

SEQ ID NO: 19	α CD74scFv::SLT-1A::KDEL variante 4	MDIQLTQSPLSLPVTLGQPASISCR SSQSLVHRNGNTYLHWFQQRPQQ SPRLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQS SHVPPTFGAGTRLEIKGSTSGSGK PGSGEGSTKGQVQLQQSGSELKK PGASVKVSCKASGYTFTNYGVN WIKQAPGQGLQWMGWNPNTGE PTFDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYL QISSLKADDTAVYFCSRSRGKNEA WFAYWGQGTLLTVSSEFPKPSTP PGSSGGAPGILGFVFTLKEFTLDFS TAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISS GGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGI DPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTT AVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGM QINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQ SVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQ RGFRTTLDDLGRSYVMATAEDVD LTLNWGRLLSVLPDYHGGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SRVARKDEL
SEQ ID NO: 20	α HER2-V _H H::SLT-1A::KDEL variante 1	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQR ELVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYQLQMNSLKPEDTAV YYCKRFRTAAQGTDYWGQGTQV TVSSAHHSEDPSSKAPKAPKEFTL DFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQ TISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVD VRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLY VTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTF PGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSG TSLTQSVARAMLRFVTVTAEALR FRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMATA EDVDLTLNWGRLLSVLPDYHGGQD SVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASRVARKDEL

SEQ ID NO: 21	α HER2-V _H H::SLT-1A::KDEL variante 2	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQR ELVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYQLQMNSLKPEDTAV YYCKRFRTAAQGTDYWGQGTQV TVSSEFPKPSTPPGSSGGAPKEFTL DFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQ TISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVD VRGIDPEEGRFNNRLLIVERNNLY VTGFVNRTNNVFYRFADFSHVT PGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSG TSLTQSVARAMLRFTVTAEALR FRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVM TAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQD SVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHASRVARKDEL
SEQ ID NO: 22	α HER2-V _H H::SLT-1A::KDEL variante 3	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQR ELVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYQLQMNSLKPEDTAV YYCKRFRTAAQGTDYWGQGTQV TVSSAHHSEDPSSKAPKAPGILGF VFTLKEFTLDFSTAKTYVDSLNV IRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGS GDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRL LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSY LDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLS GRSYVMATAEDVDLTLNWGRLLSS VLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAI LGSVALILNCHHHASRVARKDEL

SEQ ID NO: 23	α HER2-V _H H::SLT-1A::KDEL variante 4	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQR ELVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAV YYCKRFRTAAQGT DYWGQGTQV TVSSEFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLKEFTLDFSTAKTYVDSL NVI RSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGS GDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSY LDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFV TVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL S GRSYVM TAEDVDLTLNWGR LSS VLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAI LGSVALILNCHHHASRVARKDEL
SEQ ID NO: 24	α HER2-V _H H::StxA::KDEL variante 1	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQR ELVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVY LQMNSLKPEDTAV YYCKRFRTAAQGT DYWGQGTQV TVSSAHHSEDPSSKAPKAPKEFTL DFSTAKTYVDSL NVIRSAIGTPLQ TISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVD VRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLY VTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTF PGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSG TSLTQSVARAMLRFVTVTAEALR FRQIQRGFRTTLDDL SGRSYVM TA EDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQD SVRVGRISFGSINAILGSVALILNS HHHASRVARKDEL

SEQ ID NO: 25	α HER2-V _H H::StxA::KDEL variante 2	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQR ELVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAV YYCKRFRTAAQGTDYWGQGTQV TVSSEFPKPSTPPGSSGGAPKEFTL DFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQ TISSGGTSLLMIDSGTGDNLFAVD VRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLY VTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTF PGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSG TSLTQSVARAMLRFVTVTAELR FRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTA EDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQD SVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASRVARKDEL
SEQ ID NO: 26	α HER2-V _H H::StxA::KDEL variante 3	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQR ELVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLMNSLKPEDTAV YYCKRFRTAAQGTDYWGQGTQV TVSSAHHSEDPSSKAPKAPGILGF VFTLGILGFVFTLKEFTLDFSTAKT YVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTS LLMIDSGTGDNLFAVDVRGIDPEE GRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINR HSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVAR AMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRT TLDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRIS FGSINAILGSVALILNCHHHASRV ARKDEL

SEQ ID NO: 27	α HER2-V _H H::StxA::KDEL variante 4	MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQR ELVALISSIGDTYYADSVKGRFTIS RDNAKNTVYLYQMNSLKPEDTAV YYCKRFRTAAQGTQDYWGQGTQV TVSSEFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLGILGFVFTLKEFTLDFSTAKT YVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTS LLMIDSGTGDNLFAVDVRGIDPEE GRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINR HSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVAR AMLRFTVTAEALRFRQIQRGFRT TLDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRIS FGSINAILGSVALILNSHHASRVA RKDEL
SEQ ID NO: 28	α CD20-FN3::SLT-1A::KDEL	MASVSDVPRDLEVVAATPTSLNIS WCRQRCADSYRITYGETGGNSPV QEFTVPGSWKTATISGLKPGVDYT ITVYVVTHYYGWDYSHPI TGSMEFPKPSTPPGSSGGAPKEFT LDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPL QTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAV DVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNL YVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVT FPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSG TSLTQSVARAMLRFTVTAEALR FRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTA EDVDLTLNWGRLLSVLPDYHGQD SVRVGRISFGSINAILGSVALILNS HHASRVARKDEL
SEQ ID NO: 29	StxA:: α CD20-FN3::KDEL	MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTDN LFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVE RNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLM SHSGTSLTQSVARAMLRFTVTAE EALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSY VMTAEDVDLTLNWGRLLSVLPDY HGQDSVRVGRISFGSINAILGSA LILNCHHHASRVAREFPKPSTPPG SSGGAPASVSDVPRDLEVVAATPT SLLISWCRQRCADSYRITYGETGG NSPVQEFTVPGSWKTATISGLKPG VDYTITVYVVTHYYGWDYSHPI SINYRTGSKDEL
SEQ ID NO: 30	IL-2::SLT-1K::KDEL variante 1	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY

		MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLTEFPKPSTPPG SSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSL VIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSG SGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSY LDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFV TVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL GRSYVMATAEDVDLTLNWGRLLSS VLPDYHGGQDSVRVGRISFGSINAI LGSVALILNCHHHASRVARKDEL
SEQ ID NO: 31	IL-2::SLT-1K::KDEL variante 2	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLTEFPKPSTPPG SSGGAPGILGFVFTLKEFTLDFSTA KTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGG TSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDP EEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVT LSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQIN RHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSV RAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGF RTTLDDLSSGRSYVMATAEDVDLTL NWGRLLSSVLPDYHGGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASRV ARKDEL

SEQ ID NO: 32	IL-2::StxA::KDEL variante 1	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLTEFPKPSTPPG SSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSL VIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSG TGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNL RLIVERNNLYVTGFVNRTNNVYF RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLS VLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAI LGSVALILNCHHHASRVARKDEL
SEQ ID NO: 33	IL-2::StxA::KDEL variante 2	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLDLQ MILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEE VLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIV LELKGSETTFMCEYADETATIVEF LNRWITFCQSIISTLTEFPKPSTPPG SSGGAPGILGFVFTLKEFTLDFSTA KTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGG TSLLMIDSGTGDNLFAVDVRGIDP EEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVT LSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQIN RHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSV RAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGF RTTLDDLSSGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHHASRV ARKDEL

CLÁUSULAS

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5
- <110> MOLECULAR TEMPLATES, INC.
- 10
- <120> PROTEÍNAS QUE COMPRENDEN REGIONES DE UNIÓN, REGIONES EFECTORAS DE LA SUBUNIDAD A DE TOXINA SHIGA Y MOTIVOS SEÑAL DE LOCALIZACIÓN DE RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO CARBOXY TERMINAL
- <130> P45254EP-D1-PCT
- 15
- <140> EP15716202.5
<141> 2015-03-10
- <150> 61/951,110
<151> 2014-03-11

<160> 110

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 293

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 1

Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
1 5 10 15

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
20 25 30

Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
35 40 45

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
50 55 60

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly
65 70 75 80

Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser
85 90 95

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser
100 105 110

Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met
115 120 125

Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser
130 135 140

His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg
145 150 155 160

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg
165 170 175

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
180 185 190

Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
195 200 205

Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
210 215 220

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu

ES 2 864 124 T3

	225		230		235		240
5	Asn Cys His His	His 245	Ala Ser Arg Val	Ala 250	Arg Met Ala Ser	Asp 255	Glu
10	Phe Pro Ser Met	Cys 260	Pro Ala Asp Gly	Arg 265	Val Arg Gly Ile	Thr 270	His
15	Asn Lys Ile	Leu 275	Trp Asp Ser Ser	Thr 280	Leu Gly Ala Ile	Leu 285	Met Arg
20	Arg Thr Ile	Ser 290	Ser				
25	<210> 2						
	<211> 293						
	<212> PRT						
	<213> Shigella dysenteriae						
30	<400> 2						
	Lys Glu Phe Thr	Leu 5	Asp Phe Ser Thr	Ala 10	Lys Thr Tyr Val	Asp 15	Ser
35	Leu Asn Val	Ile 20	Arg Ser Ala Ile	Gly 25	Thr Pro Leu Gln	Thr 30	Ile Ser
40	Ser Gly Gly	Thr 35	Ser Leu Leu Met	Ile 40	Asp Ser Gly	Thr 45	Gly Asp Asn
45	Leu Phe Ala	Val 50	Asp Val Arg Gly	Ile 55	Asp Pro Glu	Glu 60	Gly Arg Phe
50	Asn Asn Leu	Arg 65	Leu Ile Val	Glu 70	Arg Asn Asn	Leu 75	Tyr Val Thr Gly
55	Phe Val Asn	Arg 85	Thr Asn Asn Val	Phe 90	Tyr Arg Phe	Ala 95	Asp Phe Ser
60	His Val Thr	Phe 100	Pro Gly Thr Thr	Ala 105	Val Thr Leu Ser	Gly 110	Asp Ser
65	Ser Tyr Thr	Thr 115	Leu Gln Arg Val	Ala 120	Gly Ile Ser Arg	Thr 125	Gly Met
	Gln Ile Asn	Arg 130	His Ser Leu	Thr 135	Thr Ser Tyr	Leu 140	Asp Leu Met Ser
	His Ser Gly	Thr 145	Ser Leu Thr	Gln 150	Ser Val Ala	Arg 155	Ala Met Leu Arg
	Phe Val Thr	Val 165	Thr Ala Glu	Ala 170	Leu Arg Phe	Arg 175	Gln Ile Gln Arg

ES 2 864 124 T3

Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met
 180 185 190
 5 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser
 195 200 205
 10 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile
 210 215 220
 15 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu
 225 230 235 240
 20 Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu
 245 250 255
 Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His
 260 265 270
 25 Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg
 275 280 285
 30 Arg Thr Ile Ser Ser
 290
 <210> 3
 35 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli
 <400> 3
 40 Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser
 1 5 10 15
 45 Leu Asn Ser Ile Arg Ser Ala Ile Ser Thr Pro Leu Gly Asn Ile Ser
 20 25 30
 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn
 35 40 45
 50 Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe
 50 55 60
 55 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly
 65 70 75 80
 60 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser
 85 90 95
 65 His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met

ES 2 864 124 T3

	115		120		125											
5	Gln	Ile	Gly	Arg	His	Ser	Leu	Val	Gly	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Met	Glu
	130						135					140				
10	Phe	Arg	Gly	Arg	Ser	Met	Thr	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Met	Leu	Arg
	145					150					155					160
15	Phe	Val	Thr	Val	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile	Gln	Arg
					165					170					175	
20	Gly	Phe	Arg	Pro	Ala	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Pro	Leu	Tyr	Thr	Met	Thr
				180					185					190		
25	Ala	Gln	Asp	Val	Asp	Leu	Thr	Leu	Asn	Trp	Gly	Arg	Ile	Ser	Asn	Val
			195					200					205			
30	Leu	Pro	Glu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Val	Arg	Ile	Gly	Arg	Ile	Ser
	210						215					220				
35	Phe	Asn	Ser	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	Ala	Val	Ile	Leu	Asn
	225					230					235					240
40	Cys	His	Ser	Thr	Gly	Ser	Tyr	Ser	Val	Arg	Ser	Val	Ser	Gln	Lys	Gln
					245					250					255	
45	Lys	Thr	Glu	Cys	Gln	Ile	Val	Gly	Asp	Arg	Ala	Ala	Ile	Lys	Val	Asn
				260					265					270		
50	Asn	Val	Leu	Trp	Glu	Ala	Asn	Thr	Ile	Ala	Ala	Leu	Leu	Asn	Arg	Lys
			275					280					285			
55	Pro	Gln	Asp	Leu	Thr	Glu	Pro	Asn	Gln							
	290						295									
60	<210>	4														
	<211>	516														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
65	<220>															
	<221>	origen														
	<223>	/nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"														
70	<400>	4														
	Met	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
	1				5					10				15		
75	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Asn	Thr
				20					25					30		
80	Ala	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
			35					40					45			

ES 2 864 124 T3

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 5 Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 10 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
 85 90 95
 15 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser
 100 105 110
 20 Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln
 115 120 125
 25 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 130 135 140
 30 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
 145 150 155 160
 35 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
 165 170 175
 40 Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190
 45 Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
 195 200 205
 50 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp
 210 215 220
 55 Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 60 Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser
 245 250 255
 65 Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys
 260 265 270
 70 Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro
 275 280 285
 75 Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser
 290 295 300
 80 Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro
 305 310 315 320

ES 2 864 124 T3

Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn
 325 330 335
 5 Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg
 340 345 350
 10 Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr
 355 360 365
 15 Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile
 370 375 380
 20 Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr
 385 390 395 400
 Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala
 405 410 415
 25 Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe
 420 425 430
 30 Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly
 435 440 445
 35 Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp
 450 455 460
 40 Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val
 465 470 475 480
 Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser
 485 490 495
 45 Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
 500 505 510
 50 Lys Asp Glu Leu
 515
 55 <210> 5
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 65 <400> 5
 Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr

ES 2 864 124 T3

	20	25	30	
5	Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu	35	40	45
10	Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser	50	55	60
15	Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln	65	70	75
20	Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro	85	90	95
25	Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser	100	105	110
30	Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln	115	120	125
35	Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg	130	135	140
40	Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His	145	150	155
45	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile	165	170	175
50	Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg	180	185	190
55	Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met	195	200	205
60	Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp	210	215	220
65	Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu	225	230	235
70	Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser	245	250	255
75	Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Lys Glu	260	265	270
80	Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn	275	280	285
85	Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly			

ES 2 864 124 T3

	290		295		300											
5	Gly 305	Thr	Ser	Leu	Leu	Met 310	Ile	Asp	Ser	Gly	Ser 315	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe 320
10	Ala	Val	Asp	Val	Arg 325	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu 330	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn 335	Asn
15	Leu	Arg	Leu	Ile 340	Val	Glu	Arg	Asn	Asn 345	Leu	Tyr	Val	Thr	Gly 350	Phe	Val
20	Asn	Arg	Thr 355	Asn	Asn	Val	Phe	Tyr 360	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe 365	Ser	His	Val
25	Thr	Phe 370	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala 375	Val	Thr	Leu	Ser	Gly 380	Asp	Ser	Ser	Tyr
30	Thr 385	Thr	Leu	Gln	Arg	Val 390	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg 395	Thr	Gly	Met	Gln	Ile 400
35	Asn	Arg	His	Ser	Leu 405	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu 410	Asp	Leu	Met	Ser	His 415	Ser
40	Gly	Thr	Ser	Leu 420	Thr	Gln	Ser	Val	Ala 425	Arg	Ala	Met	Leu	Arg 430	Phe	Val
45	Thr	Val	Thr 435	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg 440	Phe	Arg	Gln	Ile	Gln 445	Arg	Gly	Phe
50	Arg	Thr 450	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu 455	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr 460	Val	Met	Thr	Ala
55	Glu	Asp	Val	Asp	Leu	Thr 470	Leu	Asn	Trp	Gly	Arg 475	Leu	Ser	Ser	Val	Leu 480
60	Pro	Asp	Tyr	His	Gly 485	Gln	Asp	Ser	Val	Arg 490	Val	Gly	Arg	Ile	Ser 495	Phe
65	Gly	Ser	Ile	Asn 500	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser 505	Val	Ala	Leu	Ile	Leu 510	Asn	Cys
70	His	His	His 515	Ala	Ser	Arg	Val	Ala 520	Arg	Lys	Asp	Glu	Leu 525			
75	<210>	6														
80	<211>	516														
85	<212>	PRT														
90	<213>	Secuencia Artificial														
95	<220>															
100	<221>	origen														
105	<223>	/nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"														

ES 2 864 124 T3

<400> 6
 Met Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 5 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr
 20 25 30
 10 Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 15 Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 20 Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
 85 90 95
 25 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser
 100 105 110
 30 Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln
 115 120 125
 35 Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
 130 135 140
 40 Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
 145 150 155 160
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
 165 170 175
 45 Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
 180 185 190
 50 Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
 195 200 205
 55 Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp
 210 215 220
 60 Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser
 245 250 255
 65 Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys
 260 265 270

ES 2 864 124 T3

Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro
 275 280 285
 5 Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser
 290 295 300
 10 Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro
 305 310 315 320
 15 Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn
 325 330 335
 20 Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg
 340 345 350
 25 Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr
 355 360 365
 30 Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile
 370 375 380
 35 Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr
 385 390 395 400
 40 Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala
 405 410 415
 45 Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe
 420 425 430
 50 Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly
 435 440 445
 55 Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp
 450 455 460
 60 Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val
 465 470 475 480
 65 Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser
 485 490 495
 Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg
 500 505 510
 Lys Asp Glu Leu
 515
 <210> 7
 <211> 525
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> origen

5 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 7

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

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

Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser
100 105 110

Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln
115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
130 135 140

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His
145 150 155 160

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile
165 170 175

Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
180 185 190

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met
195 200 205

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

Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser

ES 2 864 124 T3

	245	250	255
5	Ser Gly Gly Ala ₂₆₀ Pro Gly Ile Leu Gly ₂₆₅ Phe Val Phe Thr Leu ₂₇₀ Lys Glu		
10	Phe Thr Leu ₂₇₅ Asp Phe Ser Thr Ala ₂₈₀ Lys Thr Tyr Val Asp ₂₈₅ Ser Leu Asn		
15	Val Ile ₂₉₀ Arg Ser Ala Ile Gly ₂₉₅ Thr Pro Leu Gln Thr ₃₀₀ Ile Ser Ser Gly		
20	Gly ₃₀₅ Thr Ser Leu Leu Met ₃₁₀ Ile Asp Ser Gly Ser ₃₁₅ Gly Asp Asn Leu Phe ₃₂₀		
25	Ala Val Asp Val Arg ₃₂₅ Gly Ile Asp Pro Glu ₃₃₀ Glu Gly Arg Phe Asn ₃₃₅ Asn		
30	Leu Arg Leu Ile ₃₄₀ Val Glu Arg Asn Asn ₃₄₅ Leu Tyr Val Thr Gly ₃₅₀ Phe Val		
35	Asn Arg Thr ₃₅₅ Asn Asn Val Phe Tyr ₃₆₀ Arg Phe Ala Asp Phe ₃₆₅ Ser His Val		
40	Thr Phe ₃₇₀ Pro Gly Thr Thr Ala ₃₇₅ Val Thr Leu Ser Gly ₃₈₀ Asp Ser Ser Tyr		
45	Thr Thr Leu Gln Arg Val ₃₉₀ Ala Gly Ile Ser Arg ₃₉₅ Thr Gly Met Gln Ile ₄₀₀		
50	Asn Arg His Ser Leu ₄₀₅ Thr Thr Ser Tyr Leu ₄₁₀ Asp Leu Met Ser His ₄₁₅ Ser		
55	Gly Thr Ser Leu ₄₂₀ Thr Gln Ser Val Ala ₄₂₅ Arg Ala Met Leu Arg ₄₃₀ Phe Val		
60	Thr Val Thr ₄₃₅ Ala Glu Ala Leu Arg ₄₄₀ Phe Arg Gln Ile Gln ₄₄₅ Arg Gly Phe		
65	Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu ₄₅₅ Ser Gly Arg Ser Tyr ₄₆₀ Val Met Thr Ala		
70	Glu Asp Val Asp Leu Thr ₄₇₀ Leu Asn Trp Gly Arg ₄₇₅ Leu Ser Ser Val Leu ₄₈₀		
75	Pro Asp Tyr His Gly ₄₈₅ Gln Asp Ser Val Arg ₄₉₀ Val Gly Arg Ile Ser ₄₉₅ Phe		
80	Gly Ser Ile Asn ₅₀₀ Ala Ile Leu Gly Ser ₅₀₅ Val Ala Leu Ile Leu ₅₁₀ Asn Cys		
85	His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu		

ES 2 864 124 T3

	515	520	525
5	<210> 8 <211> 512 <212> PRT <213> Secuencia Artificial		
10	<220> <221> origen <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"		
15	<400> 8 Met Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu 1 5 10 15		
20	Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn 20 25 30		
25	Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45		
30	Ile Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser 50 55 60		
35	Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln 65 70 75 80		
40	Thr Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro 85 90 95		
45	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly 100 105 110		
50	Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Lys Val Gln Leu Gln Glu 115 120 125		
55	Ser Gly Pro Ser Leu Val Gln Pro Ser Gln Arg Leu Ser Ile Thr Cys 130 135 140		
60	Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg 145 150 155 160		
65	Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Arg Gly 165 170 175		
	Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr 180 185 190		
	Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln 195 200 205		
	Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Lys Thr Leu Ile Thr Thr 210 215 220		

ES 2 864 124 T3

Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 225 230 235 240
 5 Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala
 245 250 255
 10 Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
 260 265 270
 15 Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
 275 280 285
 20 Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp
 290 295 300
 Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg
 305 310 315 320
 25 Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
 325 330 335
 30 Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
 340 345 350
 35 Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp
 355 360 365
 40 Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
 370 375 380
 Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
 385 390 395 400
 45 Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
 405 410 415
 50 Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
 420 425 430
 55 Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val
 435 440 445
 Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
 450 455 460
 60 Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
 465 470 475 480
 65 Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
 485 490 495

	Leu	Asn	Cys	His	His	His	Ala	Ser	Arg	Val	Ala	Arg	Lys	Asp	Glu	Leu	
				500					505					510			
5	<210> 9 <211> 521 <212> PRT <213> Secuencia Artificial																
10	<220> <221> origen <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"																
15	<400> 9	Met	Asp	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Phe	Ser	Val	Ser	Leu
	1					5					10					15	
20	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Asp	Ile	Tyr	Asn	
				20					25					30			
25	Arg	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Asn	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
			35					40					45				
30	Ile	Ser	Gly	Ala	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	
	50						55					60					
35	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Asp	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ile	Thr	Ser	Leu	Gln	
	65					70					75					80	
40	Thr	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Trp	Ser	Thr	Pro	
					85					90					95		
45	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	
				100					105					110			
50	Ser	Gly	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly	Glu	Gly	Ser	Lys	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	
			115					120					125				
55	Ser	Gly	Pro	Ser	Leu	Val	Gln	Pro	Ser	Gln	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	Cys	
		130					135					140					
60	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Gly	Val	His	Trp	Val	Arg	
	145					150					155					160	
65	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu	Gly	Val	Ile	Trp	Arg	Gly	
					165					170					175		
70	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ala	Ala	Phe	Met	Ser	Arg	Leu	Ser	Ile	Thr	
				180					185					190			
75	Lys	Asp	Asn	Ser	Lys	Ser	Gln	Val	Phe	Phe	Lys	Met	Asn	Ser	Leu	Gln	
			195					200					205				
80	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Ala	Lys	Thr	Leu	Ile	Thr	Thr	

ES 2 864 124 T3

	210		215			220										
5	Gly 225	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr 230	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 235	Thr	Val	Thr	Val	Ser 240
10	Ser	Glu	Phe	Pro	Lys 245	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro 250	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly 255	Ala
15	Pro	Gly	Ile	Leu 260	Gly	Phe	Val	Phe	Thr 265	Leu	Lys	Glu	Phe	Thr 270	Leu	Asp
20	Phe	Ser	Thr 275	Ala	Lys	Thr	Tyr	Val 280	Asp	Ser	Leu	Asn	Val 285	Ile	Arg	Ser
25	Ala	Ile 290	Gly	Thr	Pro	Leu	Gln 295	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly 300	Gly	Thr	Ser	Leu
30	Leu 305	Met	Ile	Asp	Ser	Gly 310	Ser	Gly	Asp	Asn	Leu 315	Phe	Ala	Val	Asp	Val 320
35	Arg	Gly	Ile	Asp	Pro 325	Glu	Glu	Gly	Arg	Phe 330	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu 335	Ile
40	Val	Glu	Arg	Asn 340	Asn	Leu	Tyr	Val	Thr 345	Gly	Phe	Val	Asn	Arg 350	Thr	Asn
45	Asn	Val	Phe 355	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp 360	Phe	Ser	His	Val	Thr 365	Phe	Pro	Gly
50	Thr	Thr 370	Ala	Val	Thr	Leu	Ser 375	Gly	Asp	Ser	Ser	Tyr 380	Thr	Thr	Leu	Gln
55	Arg 385	Val	Ala	Gly	Ile	Ser 390	Arg	Thr	Gly	Met	Gln 395	Ile	Asn	Arg	His	Ser 400
60	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr 405	Leu	Asp	Leu	Met	Ser 410	His	Ser	Gly	Thr	Ser 415	Leu
65	Thr	Gln	Ser	Val 420	Ala	Arg	Ala	Met	Leu 425	Arg	Phe	Val	Thr	Val 430	Thr	Ala
	Glu	Ala	Leu 435	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile 440	Gln	Arg	Gly	Phe	Arg 445	Thr	Thr	Leu
	Asp	Asp 450	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser 455	Tyr	Val	Met	Thr	Ala 460	Glu	Asp	Val	Asp
	Leu 465	Thr	Leu	Asn	Trp	Gly 470	Arg	Leu	Ser	Ser	Val 475	Leu	Pro	Asp	Tyr	His 480
	Gly	Gln	Asp	Ser	Val	Arg	Val	Gly	Arg	Ile	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile	Asn

ES 2 864 124 T3

485 490 495

5 Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala
500 505 510

10 Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
515 520

15 <210> 10
<211> 512
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

25 <400> 10
Met Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu
1 5 10 15

30 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn
20 25 30

35 Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

40 Ile Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

45 Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln
65 70 75 80

50 Thr Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro
85 90 95

55 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly
100 105 110

60 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Lys Val Gln Leu Gln Glu
115 120 125

65 Ser Gly Pro Ser Leu Val Gln Pro Ser Gln Arg Leu Ser Ile Thr Cys
130 135 140

70 Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg
145 150 155 160

75 Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Arg Gly
165 170 175

80 Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr
180 185 190

ES 2 864 124 T3

Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln
 195 200 205
 5 Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Lys Thr Leu Ile Thr Thr
 210 215 220
 10 Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 225 230 235 240
 15 Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala
 245 250 255
 20 Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp
 260 265 270
 Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile
 275 280 285
 25 Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp
 290 295 300
 30 Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg
 305 310 315 320
 35 Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr
 325 330 335
 Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe
 340 345 350
 40 Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp
 355 360 365
 45 Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly
 370 375 380
 50 Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met
 385 390 395 400
 55 Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu
 405 410 415
 Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln
 420 425 430
 60 Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val
 435 440 445
 65 Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser
 450 455 460

ES 2 864 124 T3

Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg
 465 470 475 480
 5 Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile
 485 490 495
 10 Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
 500 505 510
 15 <210> 11
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
 <400> 11
 25 Met Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn
 20 25 30
 30 Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 35 Ile Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 40 Gly Ser Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln
 65 70 75 80
 45 Thr Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro
 85 90 95
 50 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly
 100 105 110
 55 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Lys Val Gln Leu Gln Glu
 115 120 125
 60 Ser Gly Pro Ser Leu Val Gln Pro Ser Gln Arg Leu Ser Ile Thr Cys
 130 135 140
 65 Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ile Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Arg Gly
 165 170 175
 Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr

ES 2 864 124 T3

	180							185				190				
5	Lys	Asp	Asn 195	Ser	Lys	Ser	Gln	Val 200	Phe	Phe	Lys	Met	Asn 205	Ser	Leu	Gln
10	Ala	Asp 210	Asp	Thr	Ala	Ile	Tyr 215	Phe	Cys	Ala	Lys	Thr 220	Leu	Ile	Thr	Thr
15	Gly 225	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr 230	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 235	Thr	Val	Thr	Val	Ser 240
20	Ser	Glu	Phe	Pro	Lys 245	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro 250	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly 255	Ala
25	Pro	Gly	Ile	Leu 260	Gly	Phe	Val	Phe	Thr 265	Leu	Lys	Glu	Phe	Thr 270	Leu	Asp
30	Phe	Ser	Thr 275	Ala	Lys	Thr	Tyr	Val 280	Asp	Ser	Leu	Asn	Val 285	Ile	Arg	Ser
35	Ala	Ile 290	Gly	Thr	Pro	Leu	Gln 295	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly 300	Gly	Thr	Ser	Leu
40	Leu 305	Met	Ile	Asp	Ser	Gly 310	Ser	Gly	Asp	Asn	Leu 315	Phe	Ala	Val	Asp	Val 320
45	Arg	Gly	Ile	Asp	Pro 325	Glu	Glu	Gly	Arg	Phe 330	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu 335	Ile
50	Val	Glu	Arg	Asn 340	Asn	Leu	Tyr	Val	Thr 345	Gly	Phe	Val	Asn	Arg 350	Thr	Asn
55	Asn	Val	Phe 355	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp 360	Phe	Ser	His	Val	Thr 365	Phe	Pro	Gly
60	Thr	Thr 370	Ala	Val	Thr	Leu	Ser 375	Gly	Asp	Ser	Ser	Tyr 380	Thr	Thr	Leu	Gln
65	Arg 385	Val	Ala	Gly	Ile	Ser 390	Arg	Thr	Gly	Met	Gln 395	Ile	Asn	Arg	His	Ser 400
70	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr 405	Leu	Asp	Leu	Met	Ser 410	His	Ser	Gly	Thr	Ser 415	Leu
75	Thr	Gln	Ser	Val 420	Ala	Arg	Ala	Met	Leu 425	Arg	Phe	Val	Thr	Val 430	Thr	Ala
80	Glu	Ala	Leu 435	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile 440	Gln	Arg	Gly	Phe	Arg 445	Thr	Thr	Leu
85	Asp	Asp	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr	Val	Met	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Asp

ES 2 864 124 T3

450 455 460

5 Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His
465 470 475 480

10 Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn
485 490 495

15 Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala
500 505 510

20 Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
515 520

25 <210> 12
<211> 521
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
<400> 12
Met Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

35 Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn
20 25 30

40 Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

45 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
50 55 60

50 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg
65 70 75 80

55 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

60 His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110

65 Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
115 120 125

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

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

ES 2 864 124 T3

	Val	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
					165					170					175	
5	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe
				180					185					190		
10	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
			195					200					205			
15	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
		210					215					220				
20	Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
	225					230					235					240
	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Glu	Phe	Pro	Lys	Pro	Ser
					245					250					255	
25	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Lys	Glu	Phe	Thr	Leu	Asp
				260					265					270		
30	Phe	Ser	Thr	Ala	Lys	Thr	Tyr	Val	Asp	Ser	Leu	Asn	Val	Ile	Arg	Ser
			275					280					285			
35	Ala	Ile	Gly	Thr	Pro	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Ser	Leu
		290					295					300				
40	Leu	Met	Ile	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Val
	305					310					315					320
	Arg	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile
					325					330					335	
45	Val	Glu	Arg	Asn	Asn	Leu	Tyr	Val	Thr	Gly	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Asn
				340					345					350		
50	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe	Ser	His	Val	Thr	Phe	Pro	Gly
			355					360					365			
55	Thr	Thr	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	Gln
		370					375					380				
60	Arg	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Thr	Gly	Met	Gln	Ile	Asn	Arg	His	Ser
	385					390					395					400
	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Met	Ser	His	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu
					405					410					415	
65	Thr	Gln	Ser	Val	Ala	Arg	Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Val	Thr	Val	Thr	Ala
				420					425					430		

ES 2 864 124 T3

Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu
 435 440 445
 5 Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp
 450 455 460
 10 Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His
 465 470 475 480
 15 Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn
 485 490 495
 20 Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala
 500 505 510
 Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
 515 520
 25 <210> 13
 <211> 530
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 35 <400> 13
 Met Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro
 1 5 10 15
 40 Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn
 20 25 30
 45 Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45
 50 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg
 65 70 75 80
 55 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 60 His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 65 Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 115 120 125
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala

ES 2 864 124 T3

	130		135			140										
5	Ser 145	Val	Lys	Met	Ser	Cys 150	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr 155	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr 160
10	Val	Met	His	Trp	Val 165	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly 170	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp 175	Ile
15	Gly	Tyr	Ile	Asn 180	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly 185	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu 190	Lys	Phe
20	Lys	Gly	Lys 195	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser 200	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser 205	Thr	Ala	Tyr
25	Met	Glu 210	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr 215	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala 220	Val	Tyr	Tyr	Cys
30	Ala 225	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr 230	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val 235	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly 240
35	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu 245	Thr	Val	Ser	Ser	Ala 250	Glu	Phe	Pro	Lys	Pro 255	Ser
40	Thr	Pro	Pro	Gly 260	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala 265	Pro	Gly	Ile	Leu	Gly 270	Phe	Val
45	Phe	Thr	Leu 275	Lys	Glu	Phe	Thr	Leu 280	Asp	Phe	Ser	Thr	Ala 285	Lys	Thr	Tyr
50	Val	Asp 290	Ser	Leu	Asn	Val	Ile 295	Arg	Ser	Ala	Ile	Gly 300	Thr	Pro	Leu	Gln
55	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly 310	Thr	Ser	Leu	Leu	Met 315	Ile	Asp	Ser	Gly	Ser 320
60	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe 325	Ala	Val	Asp	Val	Arg 330	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu 335	Glu
65	Gly	Arg	Phe	Asn 340	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile 345	Val	Glu	Arg	Asn	Asn 350	Leu	Tyr
70	Val	Thr	Gly 355	Phe	Val	Asn	Arg	Thr 360	Asn	Asn	Val	Phe	Tyr 365	Arg	Phe	Ala
75	Asp	Phe 370	Ser	His	Val	Thr	Phe 375	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala 380	Val	Thr	Leu	Ser
80	Gly	Asp	Ser	Ser	Tyr	Thr 390	Thr	Leu	Gln	Arg	Val 395	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg 400
85	Thr	Gly	Met	Gln	Ile	Asn	Arg	His	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp

ES 2 864 124 T3

405 410 415
 5 Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala
 420 425 430
 10 Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln
 435 440 445
 15 Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser
 450 455 460
 20 Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg
 465 470 475 480
 25 Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala
 500 505 510
 30 Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp
 515 520 525
 35 Glu Leu
 530
 40 <210> 14
 <211> 521
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 50 Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn
 20 25 30
 55 Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45
 60 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 65 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg
 65 70 75 80
 70 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

ES 2 864 124 T3

His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110
 5 Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 115 120 125
 10 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala
 130 135 140
 15 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 145 150 155 160
 20 Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 180 185 190
 25 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 30 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 210 215 220
 35 Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly
 225 230 235 240
 40 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Glu Phe Pro Lys Pro Ser
 245 250 255
 Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp
 260 265 270
 45 Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser
 275 280 285
 50 Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu
 290 295 300
 55 Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val
 305 310 315 320
 60 Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile
 325 330 335
 Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn
 340 345 350
 65 Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly
 355 360 365

Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln
370 375 380

5 Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser
385 390 395 400

10 Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu
405 410 415

15 Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala
420 425 430

20 Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu
435 440 445

25 Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp
450 455 460

30 Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His
465 470 475 480

35 Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn
485 490 495

Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala
500 505 510

40 Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
515 520

<210> 15
<211> 530
<212> PRT
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

50 <400> 15
Met Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

55 Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn
20 25 30

60 Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

65 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg

ES 2 864 124 T3

	65				70				75				80			
5	Ile	Ser	Arg	Val	Glu 85	Ala	Glu	Asp	Val	Gly 90	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met 95	Gln
10	His	Leu	Glu	Tyr 100	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly 105	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu 110	Glu	Leu
15	Lys	Gly	Ser 115	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly 120	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly 125	Glu	Gly	Ser
20	Glu	Val 130	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser 135	Gly	Pro	Glu	Leu	Ile 140	Lys	Pro	Gly	Ala
25	Ser 145	Val	Lys	Met	Ser	Cys 150	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr 155	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr 160
30	Val	Met	His	Trp	Val 165	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly 170	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp 175	Ile
35	Gly	Tyr	Ile	Asn 180	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly 185	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu 190	Lys	Phe
40	Lys	Gly	Lys 195	Ala	Thr	Leu	Thr	Ser 200	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser 205	Thr	Ala	Tyr
45	Met	Glu 210	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr 215	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala 220	Val	Tyr	Tyr	Cys
50	Ala 225	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr 230	Tyr	Gly	Ser	Arg	Val 235	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly 240
55	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu 245	Thr	Val	Ser	Ser	Ala 250	Glu	Phe	Pro	Lys	Pro 255	Ser
60	Thr	Pro	Pro	Gly 260	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala 265	Pro	Gly	Ile	Leu	Gly 270	Phe	Val
65	Phe	Thr	Leu 275	Lys	Glu	Phe	Thr	Leu 280	Asp	Phe	Ser	Thr	Ala 285	Lys	Thr	Tyr
70	Val	Asp 290	Ser	Leu	Asn	Val	Ile 295	Arg	Ser	Ala	Ile	Gly 300	Thr	Pro	Leu	Gln
75	Thr 305	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly 310	Thr	Ser	Leu	Leu	Met 315	Ile	Asp	Ser	Gly	Ser 320
80	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe 325	Ala	Val	Asp	Val	Arg 330	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu 335	Glu
85	Gly	Arg	Phe	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Val	Glu	Arg	Asn	Asn	Leu	Tyr

ES 2 864 124 T3

	340	345	350
5	Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala	355	360 365
10	Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser	370	375 380
15	Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg	385	390 395 400
20	Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp	405	410 415
25	Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala	420	425 430
30	Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln	435	440 445
35	Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser	450	455 460
40	Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg	465	470 475 480
45	Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val	485	490 495
50	Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala	500	505 510
55	Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp	515	520 525
60	Glu Leu	530	
65	<210> 16		
	<211> 522		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia Artificial		
	<220>		
	<221> origen		
	<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"		
	<400> 16		
	Met Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu	1	5 10 15
	Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His	20	25 30

ES 2 864 124 T3

Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45
 5 Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
 50 55 60
 10 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 15 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
 85 90 95
 20 Ser Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 115 120 125
 25 Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
 130 135 140
 30 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 145 150 155 160
 35 Thr Asn Tyr Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 165 170 175
 40 Gln Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp
 180 185 190
 Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser
 195 200 205
 45 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val
 210 215 220
 50 Tyr Phe Cys Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr
 225 230 235 240
 55 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro
 245 250 255
 60 Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu
 260 265 270
 Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg
 275 280 285
 65 Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser
 290 295 300

ES 2 864 124 T3

Leu 305 Leu 305 Met 305 Ile 305 Asp 310 Ser 310 Gly 310 Ser 310 Gly 315 Asp 315 Asn 315 Leu 315 Phe 315 Ala 315 Val 320 Asp 320
 5 Val 325 Arg 325 Gly 325 Ile 325 Asp 325 Pro 325 Glu 325 Glu 325 Gly 330 Arg 330 Phe 330 Asn 330 Asn 330 Leu 335 Arg 335 Leu 335
 10 Ile 340 Val 340 Glu 340 Arg 340 Asn 340 Asn 340 Leu 340 Tyr 345 Val 345 Thr 345 Gly 345 Phe 345 Val 350 Asn 350 Arg 350 Thr 350
 15 Asn 355 Asn 355 Val 355 Phe 355 Tyr 355 Arg 355 Phe 360 Ala 360 Asp 360 Phe 360 Ser 360 His 365 Val 365 Thr 365 Phe 365 Pro 365
 20 Gly 370 Thr 370 Thr 370 Ala 370 Val 370 Thr 375 Leu 375 Ser 375 Gly 375 Asp 375 Ser 380 Ser 380 Tyr 380 Thr 380 Thr 380 Leu 380
 25 Gln 385 Arg 385 Val 385 Ala 385 Gly 390 Ile 390 Ser 390 Arg 390 Thr 390 Gly 395 Met 395 Gln 395 Ile 395 Asn 395 Arg 395 His 400
 30 Ser 405 Leu 405 Thr 405 Thr 405 Ser 405 Tyr 405 Leu 405 Asp 410 Leu 410 Met 410 Ser 410 His 410 Ser 415 Gly 415 Thr 415 Ser 415
 35 Ala 420 Glu 420 Ala 420 Leu 420 Arg 420 Phe 420 Arg 420 Gln 440 Ile 440 Gln 440 Arg 440 Gly 445 Phe 445 Arg 445 Thr 445 Thr 445
 40 Leu 450 Asp 450 Asp 450 Leu 450 Ser 450 Gly 455 Arg 455 Ser 455 Tyr 455 Val 460 Met 460 Thr 460 Ala 460 Glu 460 Asp 460 Val 460
 45 Asp 465 Leu 465 Thr 465 Leu 465 Asn 470 Trp 470 Gly 470 Arg 470 Leu 470 Ser 475 Ser 475 Val 475 Leu 475 Pro 475 Asp 480 Tyr 480
 50 Asn 485 Ala 485 Ile 485 Leu 485 Gly 485 Ser 485 Val 485 Ala 490 Leu 490 Ile 490 Leu 490 Asn 490 Cys 495 His 495 His 495 His 495
 55 Ala 515 Ser 515 Arg 515 Val 515 Ala 515 Arg 515 Lys 520 Asp 520 Glu 520 Leu 520
 60 <210> 17
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 17
 Met Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu

ES 2 864 124 T3

	1		5					10					15			
5	Gly	Gln	Pro	Ala ₂₀	Ser	Ile	Ser	Cys ₂₅	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu ₃₀	Val	His
10	Arg	Asn	Gly ₃₅	Asn	Thr	Tyr	Leu	His ₄₀	Trp	Phe	Gln	Gln	Arg ₄₅	Pro	Gly	Gln
15	Ser	Pro ₅₀	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr ₅₅	Thr	Val	Ser	Asn	Arg ₆₀	Phe	Ser	Gly	Val
20	Pro ₆₅	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly ₇₀	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr ₇₅	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys ₈₀
25	Ile	Ser	Arg	Val	Glu ₈₅	Ala	Glu	Asp	Val	Gly ₉₀	Val	Tyr	Phe	Cys	Ser ₉₅	Gln
30	Ser	Ser	His	Val ₁₀₀	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly ₁₀₅	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu ₁₁₀	Glu	Ile
35	Lys	Gly	Ser ₁₁₅	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly ₁₂₀	Lys	Pro	Gly	Ser	Gly ₁₂₅	Glu	Gly	Ser
40	Thr	Lys ₁₃₀	Gly	Gln	Val	Gln	Leu ₁₃₅	Gln	Gln	Ser	Gly	Ser ₁₄₀	Glu	Leu	Lys	Lys
45	Pro ₁₄₅	Gly	Ala	Ser	Val	Lys ₁₅₀	Val	Ser	Cys	Lys	Ala ₁₅₅	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe ₁₆₀
50	Thr	Asn	Tyr	Gly	Val ₁₆₅	Asn	Trp	Ile	Lys	Gln ₁₇₀	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly ₁₇₅	Leu
55	Gln	Trp	Met	Gly ₁₈₀	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn ₁₈₅	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr ₁₉₀	Phe	Asp
60	Asp	Asp	Phe ₁₉₅	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala ₂₀₀	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr ₂₀₅	Ser	Val	Ser
65	Thr	Ala ₂₁₀	Tyr	Leu	Gln	Ile	Ser ₂₁₅	Ser	Leu	Lys	Ala	Asp ₂₂₀	Asp	Thr	Ala	Val
70	Tyr ₂₂₅	Phe	Cys	Ser	Arg	Ser ₂₃₀	Arg	Gly	Lys	Asn	Glu ₂₃₅	Ala	Trp	Phe	Ala	Tyr ₂₄₀
75	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr ₂₄₅	Leu	Val	Thr	Val	Ser ₂₅₀	Ser	Glu	Phe	Pro	Lys ₂₅₅	Pro
80	Ser	Thr	Pro	Pro ₂₆₀	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly ₂₆₅	Ala	Pro	Gly	Ile	Leu ₂₇₀	Gly	Phe
85	Val	Phe	Thr	Leu	Lys	Glu	Phe	Thr	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Ala	Lys	Thr

ES 2 864 124 T3

	275		280		285											
5	Tyr	Val	Asp	Ser	Leu	Asn	Val	Ile	Arg	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Pro	Leu
		290					295					300				
10	Gln	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Met	Ile	Asp	Ser	Gly
	305					310					315					320
15	Ser	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Val	Arg	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu
					325					330					335	
20	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Val	Glu	Arg	Asn	Asn	Leu
				340					345					350		
25	Tyr	Val	Thr	Gly	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Asn	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg	Phe
			355					360					365			
30	Ala	Asp	Phe	Ser	His	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Thr	Leu
		370					375					380				
35	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	Gln	Arg	Val	Ala	Gly	Ile	Ser
	385					390					395					400
40	Arg	Thr	Gly	Met	Gln	Ile	Asn	Arg	His	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu
					405					410					415	
45	Asp	Leu	Met	Ser	His	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Val	Ala	Arg
				420					425					430		
50	Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Val	Thr	Val	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg
			435					440					445			
55	Gln	Ile	Gln	Arg	Gly	Phe	Arg	Thr	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Ser	Gly	Arg
	450						455					460				
60	Ser	Tyr	Val	Met	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Leu	Thr	Leu	Asn	Trp	Gly
	465					470					475					480
65	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Leu	Pro	Asp	Tyr	His	Gly	Gln	Asp	Ser	Val	Arg
					485					490					495	
70	Val	Gly	Arg	Ile	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Val
				500					505					510		
75	Ala	Leu	Ile	Leu	Asn	Cys	His	His	His	Ala	Ser	Arg	Val	Ala	Arg	Lys
			515					520					525			
80	Asp	Glu	Leu													
		530														

<210> 18

<211> 522
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 18

10 Met Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu
 1 5 10 15

15 Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His
 20 25 30

20 Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln
 35 40 45

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

25 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80

30 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
 85 90 95

35 Ser Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile
 100 105 110

40 Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
 130 135 140

45 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 145 150 155 160

50 Thr Asn Tyr Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 165 170 175

55 Gln Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp
 180 185 190

60 Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser
 195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val
 210 215 220

65 Tyr Phe Cys Ser Arg Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr
 225 230 235 240

ES 2 864 124 T3

Trp Gly Gln Gly Thr₂₄₅ Leu Val Thr Val Ser₂₅₀ Ser Glu Phe Pro Lys₂₅₅ Pro
 5 Ser Thr Pro Pro₂₆₀ Gly Ser Ser Gly Gly₂₆₅ Ala Pro Lys Glu Phe₂₇₀ Thr Leu
 10 Asp Phe Ser₂₇₅ Thr Ala Lys Thr Tyr₂₈₀ Val Asp Ser Leu Asn₂₈₅ Val Ile Arg
 15 Ser Ala₂₉₀ Ile Gly Thr Pro Leu₂₉₅ Gln Thr Ile Ser Ser₃₀₀ Gly Gly Thr Ser
 20 Leu₃₀₅ Leu Met Ile Asp Ser₃₁₀ Gly Ser Gly Asp Asn₃₁₅ Leu Phe Ala Val Asp₃₂₀
 Val Arg Gly Ile Asp₃₂₅ Pro Glu Glu Gly Arg₃₃₀ Phe Asn Asn Leu Arg₃₃₅ Leu
 25 Ile Val Glu Arg₃₄₀ Asn Asn Leu Tyr Val₃₄₅ Thr Gly Phe Val Asn₃₅₀ Arg Thr
 30 Asn Asn Val₃₅₅ Phe Tyr Arg Phe Ala₃₆₀ Asp Phe Ser His Val₃₆₅ Thr Phe Pro
 35 Gly Thr₃₇₀ Thr Ala Val Thr Leu₃₇₅ Ser Gly Asp Ser Ser₃₈₀ Tyr Thr Thr Leu
 40 Gln Arg Val Ala Gly Ile₃₉₀ Ser Arg Thr Gly Met₃₉₅ Gln Ile Asn Arg His₄₀₀
 Ser Leu Thr Thr Ser₄₀₅ Tyr Leu Asp Leu Met₄₁₀ Ser His Ser Gly Thr₄₁₅ Ser
 45 Leu Thr Gln Ser₄₂₀ Val Ala Arg Ala Met₄₂₅ Leu Arg Phe Val Thr₄₃₀ Val Thr
 50 Ala Glu Ala₄₃₅ Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe₄₄₅ Arg Thr Thr
 55 Leu Asp₄₅₀ Asp Leu Ser Gly Arg₄₅₅ Ser Tyr Val Met Thr₄₆₀ Ala Glu Asp Val
 60 Asp Leu Thr Leu Asn Trp₄₇₀ Gly Arg Leu Ser Ser₄₇₅ Val Leu Pro Asp Tyr₄₈₀
 His Gly Gln Asp Ser₄₈₅ Val Arg Val Gly Arg₄₉₀ Ile Ser Phe Gly Ser₄₉₅ Ile
 65 Asn Ala Ile Leu₅₀₀ Gly Ser Val Ala Leu₅₀₅ Ile Leu Asn Cys His₅₁₀ His His

Ala Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
515 520

5
<210> 19
<211> 531
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15
<400> 19
Met Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu
1 5 10 15

20
Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His
20 25 30

25
Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln
35 40 45

30
Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val
50 55 60

35
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

40
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln
85 90 95

45
Ser Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile
100 105 110

50
Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser
115 120 125

55
Thr Lys Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys
130 135 140

60
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
145 150 155 160

65
Thr Asn Tyr Gly Val Asn Trp Ile Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
165 170 175

60
Gln Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp
180 185 190

65
Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser
195 200 205

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val

ES 2 864 124 T3

	210					215					220				
5	Tyr 225	Phe	Cys	Ser	Arg	Ser 230	Arg	Gly	Lys	Asn	Glu 235	Ala	Trp	Phe	Ala Tyr 240
10	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr 245	Leu	Val	Thr	Val	Ser 250	Ser	Glu	Phe	Pro	Lys Pro 255
15	Ser	Thr	Pro	Pro 260	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly 265	Ala	Pro	Gly	Ile	Leu 270	Gly Phe
20	Val	Phe	Thr 275	Leu	Lys	Glu	Phe	Thr 280	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr 285	Ala	Lys Thr
25	Tyr	Val 290	Asp	Ser	Leu	Asn	Val 295	Ile	Arg	Ser	Ala	Ile 300	Gly	Thr	Pro Leu
30	Gln 305	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly 310	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu 315	Met	Ile	Asp	Ser Gly 320
35	Ser	Gly	Asp	Asn 325	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Val 330	Arg	Gly	Ile	Asp	Pro Glu 335
40	Glu	Gly	Arg	Phe 340	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu 345	Ile	Val	Glu	Arg	Asn 350	Asn Leu
45	Tyr	Val	Thr 355	Gly	Phe	Val	Asn	Arg 360	Thr	Asn	Asn	Val	Phe 365	Tyr	Arg Phe
50	Ala	Asp 370	Phe	Ser	His	Val	Thr 375	Phe	Pro	Gly	Thr	Thr 380	Ala	Val	Thr Leu
55	Ser 385	Gly	Asp	Ser	Ser	Tyr 390	Thr	Thr	Leu	Gln	Arg 395	Val	Ala	Gly	Ile Ser 400
60	Arg	Thr	Gly	Met	Gln 405	Ile	Asn	Arg	His	Ser 410	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr Leu 415
65	Asp	Leu	Met	Ser 420	His	Ser	Gly	Thr	Ser 425	Leu	Thr	Gln	Ser	Val 430	Ala Arg
70	Ala	Met	Leu 435	Arg	Phe	Val	Thr	Val 440	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu 445	Arg	Phe Arg
75	Gln	Ile 450	Gln	Arg	Gly	Phe	Arg 455	Thr	Thr	Leu	Asp	Asp 460	Leu	Ser	Gly Arg
80	Ser 465	Tyr	Val	Met	Thr	Ala 470	Glu	Asp	Val	Asp	Leu 475	Thr	Leu	Asn	Trp Gly 480
85	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Leu	Pro	Asp	Tyr	His	Gly	Gln	Asp	Ser	Val Arg

ES 2 864 124 T3

	485	490	495
5	Val Gly Arg Ile 500 Ser Phe Gly Ser Ile 505 Asn Ala Ile Leu Gly 510 Ser Val		
10	Ala Leu Ile 515 Leu Asn Cys His 520 His His Ala Ser Arg Val 525 Ala Arg Lys		
15	Asp Glu Leu 530		
20	<210> 20 <211> 389 <212> PRT <213> Secuencia Artificial		
25	<220> <221> origen <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"		
30	Met Glu Val Gln 5 Leu Val Glu Ser Gly 10 Gly Gly Leu Val Gln 15 Ala Gly		
35	Gly Ser Leu Arg 20 Leu Ser Cys Ala 25 Ala Ser Gly Ile Thr Phe 30 Ser Ile		
40	Asn Thr Met 35 Gly Trp Tyr Arg 40 Gln Ala Pro Gly Lys 45 Gln Arg Glu Leu		
45	Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile 55 Gly Asp Thr Tyr 60 Tyr Ala Asp Ser Val		
50	Lys Gly Arg Phe Thr 70 Ile Ser Arg Asp Asn 75 Ala Lys Asn Thr Val 80 Tyr		
55	Leu Gln Met Asn 85 Ser Leu Lys Pro Glu 90 Asp Thr Ala Val Tyr 95 Tyr Cys		
60	Lys Arg Phe Arg 100 Thr Ala Ala Gln Gly 105 Thr Asp Tyr Trp Gly 110 Gln Gly		
65	Thr Gln Val 115 Thr Val Ser Ser Ala 120 His His Ser Glu 125 Asp Pro Ser Ser		
	Lys Ala Pro Lys Ala Pro 135 Glu Phe Thr Leu 140 Asp Phe Ser Thr Ala		
	Lys Thr Tyr Val Asp 150 Ser Leu Asn Val Ile 155 Arg Ser Ala Ile Gly Thr 160		
	Pro Leu Gln Thr Ile 165 Ser Ser Gly Gly Thr 170 Ser Leu Leu Met Ile 175 Asp		

ES 2 864 124 T3

Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp
 180 185 190
 5 Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn
 195 200 205
 10 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr
 210 215 220
 15 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val
 225 230 235 240
 20 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser
 260 265 270
 25 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val
 275 280 285
 30 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg
 290 295 300
 35 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser
 305 310 315 320
 40 Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn
 325 330 335
 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser
 340 345 350
 45 Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly
 355 360 365
 50 Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala
 370 375 380
 55 Arg Lys Asp Glu Leu
 385
 <210> 21
 <211> 390
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 65 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 21
 Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly

ES 2 864 124 T3

	1		5		10		15									
5	Gly	Ser	Leu	Arg 20	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala 25	Ser	Gly	Ile	Thr	Phe 30	Ser	Ile
10	Asn	Thr	Met 35	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln 40	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln 45	Arg	Glu	Leu
15	Val	Ala 50	Leu	Ile	Ser	Ser	Ile 55	Gly	Asp	Thr	Tyr	Tyr 60	Ala	Asp	Ser	Val
20	Lys 65	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile 70	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala 75	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr 80
25	Leu	Gln	Met	Asn	Ser 85	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp 90	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr 95	Cys
30	Lys	Arg	Phe	Arg 100	Thr	Ala	Ala	Gln	Gly 105	Thr	Asp	Tyr	Trp	Gly 110	Gln	Gly
35	Thr	Gln	Val 115	Thr	Val	Ser	Ser	Glu 120	Phe	Pro	Lys	Pro	Ser 125	Thr	Pro	Pro
40	Gly	Ser 130	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro 135	Lys	Glu	Phe	Thr	Leu 140	Asp	Phe	Ser	Thr
45	Ala 145	Lys	Thr	Tyr	Val	Asp 150	Ser	Leu	Asn	Val 155	Ile	Arg	Ser	Ala	Ile	Gly 160
50	Thr	Pro	Leu	Gln	Thr 165	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly 170	Thr	Ser	Leu	Leu	Met 175	Ile
55	Asp	Ser	Gly	Ser 180	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe 185	Ala	Val	Asp	Val	Arg 190	Gly	Ile
60	Asp	Pro	Glu 195	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn 200	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile 205	Val	Glu	Arg
65	Asn	Asn 210	Leu	Tyr	Val	Thr	Gly 215	Phe	Val	Asn	Arg	Thr 220	Asn	Asn	Val	Phe
	Tyr 225	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe 230	Ser	His	Val	Thr	Phe 235	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala 240
	Val	Thr	Leu	Ser	Gly 245	Asp	Ser	Ser	Tyr	Thr 250	Thr	Leu	Gln	Arg	Val 255	Ala
	Gly	Ile	Ser	Arg 260	Thr	Gly	Met	Gln	Ile 265	Asn	Arg	His	Ser	Leu 270	Thr	Thr
	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Met	Ser	His	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser

ES 2 864 124 T3

275 280 285

5 Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu
290 295 300

10 Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu
305 310 315 320

15 Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu
325 330 335

20 Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp
340 345 350

25 Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu
355 360 365

30 Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val
370 375 380

35 Ala Arg Lys Asp Glu Leu
385 390

<210> 22
<211> 398
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

40 <400> 22
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

45 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

50 Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

55 Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

60 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

65 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

ES 2 864 124 T3

	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	His	His	Ser	Glu	Asp	Pro	Ser	Ser
			115					120					125			
5	Lys	Ala	Pro	Lys	Ala	Pro	Gly	Ile	Leu	Gly	Phe	Val	Phe	Thr	Leu	Lys
		130					135					140				
10	Glu	Phe	Thr	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Ala	Lys	Thr	Tyr	Val	Asp	Ser	Leu
	145					150					155					160
15	Asn	Val	Ile	Arg	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Pro	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser	Ser
					165					170					175	
20	Gly	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Met	Ile	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Asn	Leu
				180					185					190		
25	Phe	Ala	Val	Asp	Val	Arg	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn
			195					200					205			
30	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Val	Glu	Arg	Asn	Asn	Leu	Tyr	Val	Thr	Gly	Phe
		210					215					220				
35	Val	Asn	Arg	Thr	Asn	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe	Ser	His
	225					230					235					240
40	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser
					245					250					255	
45	Tyr	Thr	Thr	Leu	Gln	Arg	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Thr	Gly	Met	Gln
				260					265					270		
50	Ile	Asn	Arg	His	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Met	Ser	His
		275						280					285			
55	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Val	Ala	Arg	Ala	Met	Leu	Arg	Phe
		290					295					300				
60	Val	Thr	Val	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile	Gln	Arg	Gly
	305					310					315					320
65	Phe	Arg	Thr	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr	Val	Met	Thr
					325					330					335	
70	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Leu	Thr	Leu	Asn	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Val
				340					345					350		
75	Leu	Pro	Asp	Tyr	His	Gly	Gln	Asp	Ser	Val	Arg	Val	Gly	Arg	Ile	Ser
			355					360					365			
80	Phe	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	Ala	Leu	Ile	Leu	Asn
		370					375					380				

Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
385 390 395

5
<210> 23
<211> 399
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15
<400> 23
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

20
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

25
Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

30
Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

35
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

40
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

45
Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

50
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro
115 120 125

55
Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu
130 135 140

60
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser
145 150 155 160

65
Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser
165 170 175

70
Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn
180 185 190

75
Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe
195 200 205

80
Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly

ES 2 864 124 T3

	210	215	220
5	Phe Val Asn Arg Thr	Asn Asn Val Phe Tyr	Arg Phe Ala Asp Phe Ser
	225	230	235 240
10	His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr	Ala Val Thr Leu Ser Gly	Asp Ser
	245	250	255
15	Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val	Ala Gly Ile Ser Arg Thr	Gly Met
	260	265	270
20	Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr	Thr Ser Tyr Leu Asp	Leu Met Ser
	275	280	285
25	His Ser Gly Thr Ser Leu Thr	Gln Ser Val Ala Arg	Ala Met Leu Arg
	290	295	300
30	Phe Val Thr Val Thr	Ala Glu Ala Leu Arg	Phe Arg Gln Ile Gln Arg
	305	310	315 320
35	Gly Phe Arg Thr Thr	Leu Asp Asp Leu Ser	Gly Arg Ser Tyr Val Met
	325	330	335
40	Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr	Leu Asn Trp Gly Arg	Leu Ser Ser
	340	345	350
45	Val Leu Pro Asp Tyr His Gly	Gln Asp Ser Val Arg	Val Gly Arg Ile
	355	360	365
50	Ser Phe Gly Ser Ile Asn	Ala Ile Leu Gly Ser	Val Ala Leu Ile Leu
	370	375	380
55	Asn Cys His His His	Ala Ser Arg Val Ala	Arg Lys Asp Glu Leu
	385	390	395
60	<210> 24		
	<211> 389		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia Artificial		
65	<220>		
	<221> origen		
	<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"		
70	<400> 24		
	Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly	Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly	
	1	5	10 15
75	Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala	Ala Ser Gly Ile Thr	Phe Ser Ile
	20	25	30
80	Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg	Gln Ala Pro Gly Lys	Gln Arg Glu Leu
	35	40	45

ES 2 864 124 T3

Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 20 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala His His Ser Glu Asp Pro Ser Ser
 115 120 125
 Lys Ala Pro Lys Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala
 130 135 140
 25 Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr
 145 150 155 160
 30 Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp
 165 170 175
 35 Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp
 180 185 190
 40 Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn
 195 200 205
 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr
 210 215 220
 45 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val
 225 230 235 240
 50 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly
 245 250 255
 55 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser
 260 265 270
 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val
 275 280 285
 60 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg
 290 295 300
 65 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser
 305 310 315 320

Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn
325 330 335

5 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser
340 345 350

10 Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly
355 360 365

15 Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Ser His His His Ala Ser Arg Val Ala
370 375 380

20 Arg Lys Asp Glu Leu
385

<210> 25
<211> 390
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

30 <400> 25
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

35 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

40 Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

45 Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

50 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

55 Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

60 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro
115 120 125

65 Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr
130 135 140

Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly

ES 2 864 124 T3

	145		150		155		160									
5	Thr	Pro	Leu	Gln	Thr 165	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly 170	Thr	Ser	Leu	Leu	Met 175	Ile
10	Asp	Ser	Gly	Thr 180	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe 185	Ala	Val	Asp	Val	Arg 190	Gly	Ile
15	Asp	Pro	Glu 195	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn 200	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile 205	Val	Glu	Arg
20	Asn	Asn 210	Leu	Tyr	Val	Thr	Gly 215	Phe	Val	Asn	Arg	Thr 220	Asn	Asn	Val	Phe
25	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe 230	Ser	His	Val	Thr	Phe 235	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala 240
30	Val	Thr	Leu	Ser	Gly 245	Asp	Ser	Ser	Tyr	Thr 250	Thr	Leu	Gln	Arg	Val 255	Ala
35	Gly	Ile	Ser	Arg 260	Thr	Gly	Met	Gln	Ile 265	Asn	Arg	His	Ser	Leu 270	Thr	Thr
40	Ser	Tyr	Leu 275	Asp	Leu	Met	Ser	His 280	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu 285	Thr	Gln	Ser
45	Val	Ala 290	Arg	Ala	Met	Leu	Arg 295	Phe	Val	Thr	Val	Thr 300	Ala	Glu	Ala	Leu
50	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile	Gln 310	Arg	Gly	Phe	Arg	Thr 315	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu 320
55	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr 325	Val	Met	Thr	Ala	Glu 330	Asp	Val	Asp	Leu	Thr 335	Leu
60	Asn	Trp	Gly	Arg 340	Leu	Ser	Ser	Val	Leu 345	Pro	Asp	Tyr	His	Gly 350	Gln	Asp
65	Ser	Val	Arg 355	Val	Gly	Arg	Ile	Ser 360	Phe	Gly	Ser	Ile	Asn 365	Ala	Ile	Leu
	Gly	Ser 370	Val	Ala	Leu	Ile	Leu 375	Asn	Cys	His	His	His 380	Ala	Ser	Arg	Val
	Ala	Arg	Lys	Asp	Glu	Leu 390										
	<210>	26														
	<211>	407														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														

<220>

<221> origen

<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

5 <400> 26

Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

10 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

15 Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

20 Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80

25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

30 Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

35 Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala His His Ser Glu Asp Pro Ser Ser
115 120 125

40 Lys Ala Pro Lys Ala Pro Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Gly
130 135 140

Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser
145 150 155 160

45 Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile
165 170 175

50 Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met
180 185 190

55 Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly
195 200 205

60 Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu
210 215 220

Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val
225 230 235 240

65 Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr
245 250 255

ES 2 864 124 T3

Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val
260 265 270

5 Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr
275 280 285

10 Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln
290 295 300

15 Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala
305 310 315 320

20 Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp
325 330 335

Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr
340 345 350

25 Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln
355 360 365

30 Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile
370 375 380

35 Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg
385 390 395 400

Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
405

40

<210> 27
<211> 408
<212> PRT
45 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
50

<400> 27
Met Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly
1 5 10 15

55 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile
20 25 30

60 Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu
35 40 45

65 Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr

ES 2 864 124 T3

	65					70						75				80
5	Leu	Gln	Met	Asn	Ser ₈₅	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp ₉₀	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr ₉₅	Cys
10	Lys	Arg	Phe	Arg ₁₀₀	Thr	Ala	Ala	Gln	Gly ₁₀₅	Thr	Asp	Tyr	Trp	Gly ₁₁₀	Gln	Gly
15	Thr	Gln	Val ₁₁₅	Thr	Val	Ser	Ser	Glu ₁₂₀	Phe	Pro	Lys	Pro	Ser ₁₂₅	Thr	Pro	Pro
20	Gly	Ser ₁₃₀	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro ₁₃₅	Gly	Ile	Leu	Gly	Phe ₁₄₀	Val	Phe	Thr	Leu
25	Gly	Ile	Leu	Gly	Phe	Val ₁₅₀	Phe	Thr	Leu	Lys	Glu ₁₅₅	Phe	Thr	Leu	Asp	Phe ₁₆₀
30	Ser	Thr	Ala	Lys	Thr ₁₆₅	Tyr	Val	Asp	Ser	Leu ₁₇₀	Asn	Val	Ile	Arg	Ser ₁₇₅	Ala
35	Ile	Gly	Thr	Pro ₁₈₀	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser ₁₈₅	Ser	Gly	Gly	Thr	Ser ₁₉₀	Leu	Leu
40	Met	Ile	Asp ₁₉₅	Ser	Gly	Thr	Gly	Asp ₂₀₀	Asn	Leu	Phe	Ala	Val ₂₀₅	Asp	Val	Arg
45	Gly	Ile ₂₁₀	Asp	Pro	Glu	Glu	Gly ₂₁₅	Arg	Phe	Asn	Asn	Leu ₂₂₀	Arg	Leu	Ile	Val
50	Glu	Arg	Asn	Asn	Leu	Tyr ₂₃₀	Val	Thr	Gly	Phe	Val ₂₃₅	Asn	Arg	Thr	Asn	Asn ₂₄₀
55	Val	Phe	Tyr	Arg	Phe ₂₄₅	Ala	Asp	Phe	Ser	His ₂₅₀	Val	Thr	Phe	Pro	Gly ₂₅₅	Thr
60	Thr	Ala	Val	Thr ₂₆₀	Leu	Ser	Gly	Asp	Ser ₂₆₅	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu ₂₇₀	Gln	Arg
65	Val	Ala	Gly ₂₇₅	Ile	Ser	Arg	Thr	Gly ₂₈₀	Met	Gln	Ile	Asn	Arg ₂₈₅	His	Ser	Leu
	Thr	Thr ₂₉₀	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu ₂₉₅	Met	Ser	His	Ser	Gly ₃₀₀	Thr	Ser	Leu	Thr
	Gln	Ser	Val	Ala	Arg	Ala ₃₁₀	Met	Leu	Arg	Phe	Val ₃₁₅	Thr	Val	Thr	Ala	Glu ₃₂₀
	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg ₃₂₅	Gln	Ile	Gln	Arg	Gly ₃₃₀	Phe	Arg	Thr	Thr	Leu ₃₃₅	Asp
	Asp	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr	Val	Met	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Leu

ES 2 864 124 T3

340 345 350
 5 Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly
 355 360 365
 10 Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala
 370 375 380
 15 Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Ser His His His Ala Ser
 385 390 395 400
 20 Arg Val Ala Arg Lys Asp Glu Leu
 405
 25 <210> 28
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 28
 1 Met Ala Ser Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val Val Ala Ala
 5 10 15
 35 Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile Ser Trp Cys Arg Gln Arg Cys Ala Asp
 20 25 30
 40 Ser Tyr Arg Ile Thr Tyr Gly Glu Thr Gly Gly Asn Ser Pro Val Gln
 35 40 45
 45 Glu Phe Thr Val Pro Gly Ser Trp Lys Thr Ala Thr Ile Ser Gly Leu
 50 55 60
 50 Lys Pro Gly Val Asp Tyr Thr Ile Thr Val Tyr Val Val Thr His Tyr
 65 70 75 80
 55 Tyr Gly Trp Asp Arg Tyr Ser His Pro Ile Ser Ile Asn Tyr Arg Thr
 85 90 95
 60 Gly Ser Met Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly
 100 105 110
 65 Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr
 115 120 125
 70 Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln
 130 135 140
 75 Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser
 145 150 155 160

ES 2 864 124 T3

Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu
 165 170 175
 5 Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr
 180 185 190
 10 Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala
 195 200 205
 15 Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser
 210 215 220
 20 Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg
 225 230 235 240
 Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp
 245 250 255
 25 Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala
 260 265 270
 30 Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln
 275 280 285
 35 Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser
 290 295 300
 40 Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg
 305 310 315 320
 Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val
 325 330 335
 45 Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala
 340 345 350
 50 Leu Ile Leu Asn Ser His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Lys Asp
 355 360 365
 55 Glu Leu
 370
 <210> 29
 <211> 369
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 65 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"
 <400> 29
 Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp

ES 2 864 124 T3

	1		5					10					15			
5	Ser	Leu	Asn	Val ₂₀	Ile	Arg	Ser	Ala	Ile ₂₅	Gly	Thr	Pro	Leu	Gln ₃₀	Thr	Ile
10	Ser	Ser	Gly ₃₅	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu ₄₀	Met	Ile	Asp	Ser	Gly ₄₅	Thr	Gly	Asp
15	Asn	Leu ₅₀	Phe	Ala	Val	Asp	Val ₅₅	Arg	Gly	Ile	Asp	Pro ₆₀	Glu	Glu	Gly	Arg
20	Phe ₆₅	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu ₇₀	Ile	Val	Glu	Arg	Asn ₇₅	Asn	Leu	Tyr	Val	Thr ₈₀
25	Gly	Phe	Val	Asn	Arg ₈₅	Thr	Asn	Asn	Val	Phe ₉₀	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp ₉₅	Phe
30	Ser	His	Val	Thr ₁₀₀	Phe	Pro	Gly	Thr	Thr ₁₀₅	Ala	Val	Thr	Leu	Ser ₁₁₀	Gly	Asp
35	Ser	Ser	Tyr ₁₁₅	Thr	Thr	Leu	Gln	Arg ₁₂₀	Val	Ala	Gly	Ile	Ser ₁₂₅	Arg	Thr	Gly
40	Met	Gln ₁₃₀	Ile	Asn	Arg	His	Ser ₁₃₅	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr ₁₄₀	Leu	Asp	Leu	Met
45	Ser	His	Ser	Gly	Thr	Ser ₁₅₀	Leu	Thr	Gln	Ser	Val ₁₅₅	Ala	Arg	Ala	Met	Leu ₁₆₀
50	Arg	Phe	Val	Thr	Val ₁₆₅	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu ₁₇₀	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile ₁₇₅	Gln
55	Arg	Gly	Phe	Arg ₁₈₀	Thr	Thr	Leu	Asp	Asp ₁₈₅	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser ₁₉₀	Tyr	Val
60	Met	Thr	Ala ₁₉₅	Glu	Asp	Val	Asp	Leu ₂₀₀	Thr	Leu	Asn	Trp	Gly ₂₀₅	Arg	Leu	Ser
65	Ser	Val ₂₁₀	Leu	Pro	Asp	Tyr	His ₂₁₅	Gly	Gln	Asp	Ser	Val ₂₂₀	Arg	Val	Gly	Arg
	Ile ₂₂₅	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile ₂₃₀	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly ₂₃₅	Ser	Val	Ala	Leu	Ile ₂₄₀
	Leu	Asn	Cys	His	His ₂₄₅	His	Ala	Ser	Arg	Val ₂₅₀	Ala	Arg	Glu	Phe	Pro ₂₅₅	Lys
	Pro	Ser	Thr	Pro ₂₆₀	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly ₂₆₅	Gly	Ala	Pro	Ala	Ser ₂₇₀	Val	Ser
	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu

ES 2 864 124 T3

	275		280		285											
5	Leu	Ile	Ser	Trp	Cys	Arg	Gln	Arg	Cys	Ala	Asp	Ser	Tyr	Arg	Ile	Thr
	290						295					300				
10	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro
	305					310					315					320
15	Gly	Ser	Trp	Lys	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp
					325					330					335	
20	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Val	Val	Thr	His	Tyr	Tyr	Gly	Trp	Asp	Arg
				340					345					350		
25	Tyr	Ser	His	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Gly	Ser	Lys	Asp	Glu
			355					360					365			
30	Leu															
	<210>	30														
	<211>	405														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
35	<220>															
	<221>	origen														
	<223>	/nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"														
40	<400>	30														
	Met	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
	1				5					10					15	
45	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr
				20					25					30		
50	Lys	Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe	Lys	Phe	Tyr	Met	Pro
			35					40					45			
55	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu	Leu
	50						55					60				
60	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu	Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His
	65					70					75				80	
65	Leu	Arg	Pro	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile	Val	Leu	Glu
					85					90					95	
70	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr	Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr
				100					105					110		
75	Ala	Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile	Thr	Phe	Cys	Gln	Ser
			115					120					125			

ES 2 864 124 T3

	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Phe	Pro	Lys	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly
	130						135					140				
5	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Lys	Glu	Phe	Thr	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Ala
	145					150					155					160
10	Lys	Thr	Tyr	Val	Asp	Ser	Leu	Asn	Val	Ile	Arg	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr
					165					170					175	
15	Pro	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Met	Ile	Asp
				180					185					190		
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Asn	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Val	Arg	Gly	Ile	Asp
			195					200					205			
25	Pro	Glu	Glu	Gly	Arg	Phe	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Val	Glu	Arg	Asn
		210					215					220				
30	Asn	Leu	Tyr	Val	Thr	Gly	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Asn	Asn	Val	Phe	Tyr
	225					230					235					240
35	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe	Ser	His	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala	Val
					245					250					255	
40	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp	Ser	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	Gln	Arg	Val	Ala	Gly
				260					265					270		
45	Ile	Ser	Arg	Thr	Gly	Met	Gln	Ile	Asn	Arg	His	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser
			275					280					285			
50	Tyr	Leu	Asp	Leu	Met	Ser	His	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Val
		290					295					300				
55	Ala	Arg	Ala	Met	Leu	Arg	Phe	Val	Thr	Val	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg
	305					310					315					320
60	Phe	Arg	Gln	Ile	Gln	Arg	Gly	Phe	Arg	Thr	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Ser
					325					330					335	
65	Gly	Arg	Ser	Tyr	Val	Met	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Leu	Thr	Leu	Asn
				340					345					350		
70	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Leu	Pro	Asp	Tyr	His	Gly	Gln	Asp	Ser
			355					360					365			
75	Val	Arg	Val	Gly	Arg	Ile	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly
		370					375					380				
80	Ser	Val	Ala	Leu	Ile	Leu	Asn	Cys	His	His	His	Ala	Ser	Arg	Val	Ala
	385					390					395					400

Arg Lys Asp Glu Leu
405

5
<210> 31
<211> 414
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15
<400> 31
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

20 His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

25 Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

30 Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

35 Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

40 Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110

45 Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly
130 135 140

50 Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu Lys
145 150 155 160

55 Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu
165 170 175

60 Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser
180 185 190

65 Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu
195 200 205

Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn

ES 2 864 124 T3

	210		215		220											
5	Asn 225	Leu	Arg	Leu	Ile	Val 230	Glu	Arg	Asn	Asn	Leu 235	Tyr	Val	Thr	Gly	Phe 240
10	Val	Asn	Arg	Thr	Asn 245	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg 250	Phe	Ala	Asp	Phe	Ser 255	His
15	Val	Thr	Phe	Pro 260	Gly	Thr	Thr	Ala	Val 265	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp 270	Ser	Ser
20	Tyr	Thr	Thr 275	Leu	Gln	Arg	Val	Ala 280	Gly	Ile	Ser	Arg	Thr 285	Gly	Met	Gln
25	Ile	Asn 290	Arg	His	Ser	Leu	Thr 295	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp 300	Leu	Met	Ser	His
30	Ser 305	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr 310	Gln	Ser	Val	Ala	Arg 315	Ala	Met	Leu	Arg	Phe 320
35	Val	Thr	Val	Thr	Ala 325	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe 330	Arg	Gln	Ile	Gln	Arg 335	Gly
40	Phe	Arg	Thr	Thr 340	Leu	Asp	Asp	Leu	Ser 345	Gly	Arg	Ser	Tyr	Val 350	Met	Thr
45	Ala	Glu	Asp 355	Val	Asp	Leu	Thr	Leu 360	Asn	Trp	Gly	Arg	Leu 365	Ser	Ser	Val
50	Leu	Pro 370	Asp	Tyr	His	Gly	Gln 375	Asp	Ser	Val	Arg	Val 380	Gly	Arg	Ile	Ser
55	Phe 385	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala 390	Ile	Leu	Gly	Ser	Val 395	Ala	Leu	Ile	Leu	Asn 400
60	Cys	His	His	His	Ala 405	Ser	Arg	Val	Ala	Arg 410	Lys	Asp	Glu	Leu		
65	<210>	32														
	<211>	405														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
	<220>															
	<221>	origen														
	<223>	/nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"														
	<400>	32														
	Met	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu	Gln	Leu	Glu
	1				5				10				15			
	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln	Met	Ile 25	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn 30	Asn	Tyr

ES 2 864 124 T3

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
 35 40 45
 5 Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 50 55 60
 10 Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 65 70 75 80
 15 Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 85 90 95
 20 Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 100 105 110
 Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
 115 120 125
 25 Ile Ile Ser Thr Leu Thr Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly
 130 135 140
 30 Ser Ser Gly Gly Ala Pro Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 35 Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr
 165 170 175
 40 Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp
 180 185 190
 Ser Gly Thr Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp
 195 200 205
 45 Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn
 210 215 220
 50 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr
 225 230 235 240
 55 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val
 245 250 255
 60 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser
 275 280 285
 65 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val
 290 295 300

ES 2 864 124 T3

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg
305 310 315 320

5 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser
325 330 335

10 Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn
340 345 350

15 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser
355 360 365

20 Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly
370 375 380

Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala
385 390 395 400

25 Arg Lys Asp Glu Leu
405

30 <210> 33
<211> 414
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

40 <400> 33
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
1 5 10 15

45 His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

50 Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

55 Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

60 Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

65 Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser

ES 2 864 124 T3

	115							120					125				
5	Ile	Ile 130	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu 135	Phe	Pro	Lys	Pro	Ser 140	Thr	Pro	Pro	Gly	
10	Ser 145	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro 150	Gly	Ile	Leu	Gly	Phe 155	Val	Phe	Thr	Leu	Lys 160	
15	Glu	Phe	Thr	Leu	Asp 165	Phe	Ser	Thr	Ala	Lys 170	Thr	Tyr	Val	Asp	Ser 175		
20	Asn	Val	Ile	Arg 180	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr 185	Pro	Leu	Gln	Thr	Ile 190	Ser	Ser	
25	Gly	Gly	Thr 195	Ser	Leu	Leu	Met	Ile 200	Asp	Ser	Gly	Thr	Gly 205	Asp	Asn	Leu	
30	Phe	Ala 210	Val	Asp	Val	Arg	Gly 215	Ile	Asp	Pro	Glu	Glu 220	Gly	Arg	Phe	Asn	
35	Asn 225	Leu	Arg	Leu	Ile	Val 230	Glu	Arg	Asn	Asn	Leu 235	Tyr	Val	Thr	Gly	Phe 240	
40	Val	Asn	Arg	Thr	Asn 245	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg 250	Phe	Ala	Asp	Phe	Ser 255	His	
45	Val	Thr	Phe	Pro 260	Gly	Thr	Thr	Ala	Val 265	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp 270	Ser	Ser	
50	Tyr	Thr	Thr 275	Leu	Gln	Arg	Val	Ala 280	Gly	Ile	Ser	Arg	Thr 285	Gly	Met	Gln	
55	Ile	Asn 290	Arg	His	Ser	Leu	Thr 295	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp 300	Leu	Met	Ser	His	
60	Ser 305	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr 310	Gln	Ser	Val	Ala	Arg 315	Ala	Met	Leu	Arg	Phe 320	
65	Val	Thr	Val	Thr	Ala 325	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe 330	Arg	Gln	Ile	Gln	Arg 335	Gly	
70	Phe	Arg	Thr	Thr 340	Leu	Asp	Asp	Leu	Ser 345	Gly	Arg	Ser	Tyr	Val 350	Met	Thr	
75	Ala	Glu	Asp 355	Val	Asp	Leu	Thr	Leu 360	Asn	Trp	Gly	Arg	Leu 365	Ser	Ser	Val	
80	Leu	Pro 370	Asp	Tyr	His	Gly	Gln 375	Asp	Ser	Val	Arg	Val 380	Gly	Arg	Ile	Ser	
85	Phe	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	Ala	Leu	Ile	Leu	Asn	

	385	390	395	400
5	Ser His His His	Ala Ser Arg Val	Ala Arg Lys Asp	Glu Leu
		405	410	
10	<210> 34 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia Artificial			
15	<220> <221> origen <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"			
20	<400> 34 Lys Asp Glu Leu 1			
25	<210> 35 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia Artificial			
30	<220> <221> origen <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"			
35	<400> 35 His Asp Glu Phe 1			
40	<210> 36 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia Artificial			
45	<220> <221> origen <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"			
50	<400> 36 His Asp Glu Leu 1			
55	<210> 37 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia Artificial			
60	<220> <221> origen <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"			
65	<400> 37 Arg Asp Glu Phe 1			
	<210> 38 <211> 4 <212> PRT <213> Secuencia Artificial			

<220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

5 <400> 38
 Arg Asp Glu Leu
 1

10 <210> 39
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

20 <400> 39
 Trp Asp Glu Leu
 1

25 <210> 40
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

35 <400> 40
 Tyr Asp Glu Leu
 1

40 <210> 41
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

50 <400> 41
 His Glu Glu Phe
 1

55 <210> 42
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

65 <400> 42
 His Glu Glu Leu
 1

<210> 43
 <211> 4
 <212> PRT

```

<213> Secuencia Artificial
<220>
<221> origen
5 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 43
Lys Glu Glu Leu
10 1
<210> 44
<211> 4
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> origen
20 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 44
Arg Glu Glu Leu
1
25 <210> 45
<211> 4
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
35 <400> 45
Lys Ala Glu Leu
1
40 <210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
45 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 46
50 Lys Cys Glu Leu
1
<210> 47
55 <211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
60 <221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
<400> 47
Lys Phe Glu Leu
65 1
<210> 48

```

```

    <211> 4
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

5    <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
    <400> 48
    Lys Gly Glu Leu
10   1

    <210> 49
    <211> 4
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <221> origen
20   <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

    <400> 49
    Lys His Glu Leu
25   1

    <210> 50
    <211> 4
    <212> PRT
30   <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
35   <400> 50
    Lys Leu Glu Leu
    1

40   <210> 51
    <211> 4
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
45   <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

50   <400> 51
    Lys Asn Glu Leu
    1

55   <210> 52
    <211> 4
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

60   <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

    <400> 52
65   Lys Gln Glu Leu
    1

```

5 <210> 53
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 10 <400> 53
 Lys Arg Glu Leu
 1
 15 <210> 54
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 25 <400> 54
 Lys Ser Glu Leu
 1
 30 <210> 55
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 40 <400> 55
 Lys Val Glu Leu
 1
 45 <210> 56
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 50 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 56
 Lys Trp Glu Leu
 1
 55 <210> 57
 <211> 4
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 65 <400> 57
 Lys Tyr Glu Leu
 1

5 <210> 58
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

15 <400> 58
 Lys Glu Asp Leu
 1

20 <210> 59
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

30 <400> 59
 Lys Ile Glu Leu
 1

35 <210> 60
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

45 <400> 60
 Asp Lys Glu Leu
 1

50 <210> 61
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

60 <400> 61
 Phe Asp Glu Leu
 1

65 <210> 62
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

70 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

75 <400> 62

Lys Asp Glu Phe
1

5 <210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 63
15 Lys Lys Glu Leu
1

20 <210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 64
30 His Ala Asp Leu
1

35 <210> 65
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 65
45 His Ala Glu Leu
1

50 <210> 66
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 66
His Ile Glu Leu
1

60 <210> 67
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

5 <400> 67
 His Asn Glu Leu
 1

 <210> 68
 <211> 4
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 15 <400> 68
 His Thr Glu Leu
 1

 20 <210> 69
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 30 <400> 69
 Lys Thr Glu Leu
 1

 35 <210> 70
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

 <400> 70
 45 His Val Glu Leu
 1

 50 <210> 71
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 55 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

 <400> 71
 60 Asn Asp Glu Leu
 1

 65 <210> 72
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>

<221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 72
 5 Gln Asp Glu Leu
 1

<210> 73
 10 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 15 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 73
 20 Arg Glu Asp Leu
 1

<210> 74
 25 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 30 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 74
 Arg Asn Glu Leu
 1
 35

<210> 75
 40 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 45 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 75
 Arg Thr Asp Leu
 1
 50

<210> 76
 55 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 60 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 <400> 76
 Arg Thr Glu Leu
 1
 65

<210> 77
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

```

5      <220>
      <221> origen
      <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

      <400> 77
      Ser Asp Glu Leu
      1

10     <210> 78
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

15     <220>
      <221> origen
      <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

20     <400> 78
      Thr Asp Glu Leu
      1

25     <210> 79
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

30     <220>
      <221> origen
      <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

      <400> 79
35     Ser Lys Glu Leu
      1

40     <210> 80
      <211> 4
      <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

      <220>
45     <221> origen
      <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

      <400> 80
50     Ser Thr Glu Leu
      1

      <210> 81
      <211> 4
55     <212> PRT
      <213> Secuencia Artificial

      <220>
      <221> origen
60     <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

      <400> 81
      Glu Asp Glu Leu
      1
65

      <210> 82
      <211> 6

```

```

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <221> origen
  <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 82
10 Ala Leu Glu Asp Glu Leu
    1                    5

<210> 83
<211> 6
15 <212> PRT
  <213> Secuencia Artificial

<220>
20 <221> origen
  <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 83
25 His Ala Glu Asp Glu Leu
    1                    5

<210> 84
<211> 6
30 <212> PRT
  <213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> origen
  <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 84
His Leu Glu Asp Glu Leu
1                    5

40 <210> 85
    <211> 6
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
45 <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

50 <400> 85
    Lys Leu Glu Asp Glu Leu
    1                    5

55 <210> 86
    <211> 6
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

60 <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

65 <400> 86
    Ile Arg Ser Asp Glu Leu
    1                    5

```

```

5    <210> 87
    <211> 6
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

10   <400> 87
    Glu Arg Ser Thr Glu Leu
    1          5

15   <210> 88
    <211> 6
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

20   <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

    <400> 88
25   Arg Pro Ser Thr Glu Leu
    1          5

30   <210> 89
    <211> 6
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
35   <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

    <400> 89
40   Ala Ser Gly Gly Pro Glu
    1          5

45   <210> 90
    <211> 54
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
50   <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

    <220>
55   <221> VARIANTE
    <222> (5)..(6)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
60   <221> VARIANTE
    <222> (10)..(11)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
65   <221> VARIANTE
    <222> (15)..(16)
    <223> /sustituir=" "

    <220>

```

```

<221> VARIANTE
<222> (20)..(21)
<223> /sustituir=" "

5  <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (25)..(26)
    <223> /sustituir=" "

10 <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (30)..(31)
    <223> /sustituir=" "

15 <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (35)..(36)
    <223> /sustituir=" "

20 <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (40)..(41)
    <223> /sustituir=" "

25 <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (45)..(46)
    <223> /sustituir=" "

30 <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (50)..(51)
    <223> /sustituir=" "

35 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (1)..(54)
    <223> /nota="Los residuos de las variantes proporcionados en la secuencia no
40 tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las
    posiciones de las variantes"

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (3)..(52)
45 <223> /nota="Esta región puede comprender de 1 a 10 unidades de repetición
    'Gly Gly Gly Gly Ser', donde algunas posiciones pueden estar ausentes"

    <220>
    <221> origen
50 <223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción
    detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

    <400> 90
    Ala Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
55 1          5          10          15

    Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        20          25          30

    Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
        35          40          45

65 Gly Gly Gly Ser Ala Met
    50

```

```

5  <210> 91
   <211> 210
   <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

   <220>
   <221> origen
10  <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (2)..(6)
15  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (9)..(13)
20  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (16)..(20)
25  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (23)..(27)
30  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (30)..(34)
35  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (37)..(41)
40  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (44)..(48)
45  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (51)..(55)
50  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (58)..(62)
55  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (65)..(69)
60  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE
   <222> (72)..(76)
65  <223> /sustituir=" "

   <220>
   <221> VARIANTE

```

<222> (79)..(83)
 <223> /sustituir=" "

 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (86)..(90)
 <223> /sustituir=" "

 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (93)..(97)
 <223> /sustituir=" "

 15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (100)..(104)
 <223> /sustituir=" "

 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (107)..(111)
 <223> /sustituir=" "

 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (114)..(118)
 <223> /sustituir=" "

 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (121)..(125)
 <223> /sustituir=" "

 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (128)..(132)
 <223> /sustituir=" "

 40 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (135)..(139)
 <223> /sustituir=" "

 45 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (142)..(146)
 <223> /sustituir=" "

 50 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (149)..(153)
 <223> /sustituir=" "

 55 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (156)..(160)
 <223> /sustituir=" "

 60 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (163)..(167)
 <223> /sustituir=" "

 65 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (170)..(174)
 <223> /sustituir=" "

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (177)..(181)
 <223> /sustituir=" "
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (184)..(188)
 <223> /sustituir=" "
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (191)..(195)
 <223> /sustituir=" "
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (198)..(202)
 <223> /sustituir=" "
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (205)..(209)
 <223> /sustituir=" "
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(210)
 <223> /nota="Esta secuencia puede comprender de 1 a 30 unidades de repetición
 30 'Gly Gly Gly Gly Gly Ser', donde algunas posiciones pueden estar
 ausentes"
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(210)
 <223> /nota=" Los residuos de las variantes proporcionados en la secuencia no
 35 tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las
 posiciones de las variantes"
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota=" véase la memoria tal como se presentó para una descripción
 40 detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"
 <400> 91
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 50 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 55 35 40 45
 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 50 55 60
 60 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 65 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
 85 90 95

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
100 105 110

5 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140

15 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
145 150 155 160

20 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly
165 170 175

Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
180 185 190

25 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
195 200 205

30 Gly Ser
210

35 <210> 92
<211> 210
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

45 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(6)
<223> /sustituir=" "

50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (9)..(13)
<223> /sustituir=" "

55 <220>
<221> VARIANTE
<222> (16)..(20)
<223> /sustituir=" "

60 <220>
<221> VARIANTE
<222> (23)..(27)
<223> /sustituir=" "

65 <220>
<221> VARIANTE
<222> (30)..(34)
<223> /sustituir=" "

<220>
 <221> VARIANTE
 <222> (37)..(41)
 <223> /sustituir=" "
 5
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (44)..(48)
 <223> /sustituir=" "
 10
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (51)..(55)
 <223> /sustituir=" "
 15
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (58)..(62)
 <223> /sustituir=" "
 20
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (65)..(69)
 <223> /sustituir=" "
 25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (72)..(76)
 <223> /sustituir=" "
 30
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (79)..(83)
 <223> /sustituir=" "
 35
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (86)..(90)
 <223> /sustituir=" "
 40
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (93)..(97)
 <223> /sustituir=" "
 45
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (100)..(104)
 <223> /sustituir=" "
 50
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (107)..(111)
 <223> /sustituir=" "
 55
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (114)..(118)
 <223> /sustituir=" "
 60
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (121)..(125)
 <223> /sustituir=" "
 65
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (128)..(132)

```

    <223> /sustituir=" "
    <220>
    <221> VARIANTE
5    <222> (135)..(139)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
10   <222> (142)..(146)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
15   <222> (149)..(153)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
20   <222> (156)..(160)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
25   <222> (163)..(167)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
30   <222> (170)..(174)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
35   <222> (177)..(181)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
40   <222> (184)..(188)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
45   <222> (191)..(195)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
50   <222> (198)..(202)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> VARIANTE
55   <222> (205)..(209)
    <223> /sustituir=" "

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
60   <222> (1)..(210)
    <223> /nota=" Esta secuencia puede comprender de 1 a 30 unidades de
    repetición 'Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly, donde algunas posiciones pueden
    estar ausentes

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
65   <222> (1)..(210)

```

<223> /nota="Los residuos de las variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de las variantes"

5 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="véase la memoria tal como se presentó para una descripción detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

10 <400> 92
 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
 1 5 10 15

15 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
 20 25 30

20 Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 35 40 45

25 Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 50 55 60

30 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
 65 70 75 80

35 Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 85 90 95

40 Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
 100 105 110

45 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 115 120 125

50 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 130 135 140

55 Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 145 150 155 160

60 Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 165 170 175

65 Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
 180 185 190

70 Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 195 200 205

75 Ser Gly
 210

<210> 93
 <211> 150

```

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5  <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

10 <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (6)..(150)
    <223> /sustituir=" "

15 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (1)..(150)
    <223> /nota="Esta secuencia puede comprender de 1 a 30 unidades de repetición
    'Gly Gly Gly Gly Ser', donde algunas posiciones pueden estar ausentes"

20 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (1)..(150)
    <223> /nota="Los residuos de las variantes proporcionados en la secuencia no
25 tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las
    posiciones de las variantes"

    <220>
    <221> origen
    <223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción
30 detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

    <400> 93
    Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
    1          5          10         15

35 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

    20          25          30

40 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

    35          40          45

45 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

    50          55          60

50 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

    65          70          75          80

    Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

    85          90          95

55 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

    100         105         110

60 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

    115         120         125

65 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

    130         135         140

```

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
145 150

5 <210> 94
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (2)..(30)
<223> /sustituir=" "

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(30)
<223> /nota="Esta secuencia puede comprender de 1 a 30 residuos, en la que
25 algunas posiciones pueden estar ausentes"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(30)
<223> /nota="Los residuos de las variantes proporcionados en la secuencia no
30 tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las
posiciones de las variantes"

<220>
<221> origen
35 <223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción
detallada de las sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 94
40 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
20 25 30

45 <210> 95
<211> 12
<212> PRT
50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

55 <400> 95
Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser
1 5 10

60 <210> 96
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 96
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
 1 5 10
 5
 <210> 97
 <211> 18
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 15 <400> 97
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 20 Lys Gly
 25 <210> 98
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 35 <400> 98
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly
 1 5 10
 40 <210> 99
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 50 <400> 99
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Lys Gly
 55
 <210> 100
 <211> 14
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 65 <400> 100
 Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe
 1 5 10

5 <210> 101
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 10 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

 15 <400> 101
 Ser Arg Ser Ser Gly
 1 5

 20 <210> 102
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

 30 <400> 102
 Ser Gly Ser Ser Cys
 1 5

 35 <210> 103
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 40 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

 45 <400> 103
 Ala Met Gly Arg Ser Gly Gly Gly Cys Ala Gly Asn Arg Val Gly Ser
 1 5 10 15

 50 Ser Leu Ser Cys Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ala Met
 20 25

 55 <210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 60 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

 65 <400> 104
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

 <210> 105
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>

```

<221> origen
<223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 105
5 Gly Gly Gly Ser
1

<210> 106
10 <211> 5
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

<220>
15 <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 106
20 Gly Gly Gly Gly Ser
    1 5

<210> 107
25 <211> 8
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

<220>
30 <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 107
    Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
    1 5
35

<210> 108
40 <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

<220>
45 <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 108
    Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    1 5
50

<210> 109
55 <211> 18
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

<220>
60 <221> origen
    <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 109
    Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
    1 5 10 15
65 Ser Ser

```

<210> 110
 <211> 18
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"
 10 <400> 110
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr
 1 5 10 15

 15 Lys Gly

REIVINDICACIONES

1. Proteína que comprende

a) una región de unión capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular,
 b) una región efectora de la subunidad A de la toxina Shiga que comprende un polipéptido capaz de mostrar al menos una función de la toxina Shiga seleccionada del grupo que consiste en: internalización celular, enrutamiento subcelular y citotoxicidad;

en la que el polipéptido comprende o consiste en una secuencia que es al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada de entre:

(i) los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;

(ii) los aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;

(iii) los aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; y

(iv) los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, y

c) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL; en la que la proteína está unida a un material exógeno adicional para liberar en una célula, estando dicha célula acoplada físicamente con la biomolécula diana extracelular de dicha proteína.

2. Proteína, según la reivindicación 1, en la que el material exógeno adicional se selecciona de cualquiera de: péptido, proteína, agente citotóxico, agente promotor de detección, agente quimioterapéutico de molécula pequeña y polinucleótido.

3. Proteína, según la reivindicación 2, en la que el material exógeno adicional es un péptido o proteína que comprende un antígeno; tal como en el que el antígeno se deriva de una proteína bacteriana, una proteína viral, una proteína mutada o expresada de manera aberrante en el cáncer, o una región determinante de la complementariedad de células T.

4. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la región de unión comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

fragmento de anticuerpo de un solo dominio, fragmento variable de cadena única, fragmento de anticuerpo variable, fragmento Fd, fragmento de unión a antígeno, 10^o dominio de tipo III de fibronectina derivado de fibronectina, dominio de tipo III de tenascina, dominio del motivo de repetición de anquirina, dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad, lipocalina, dominio Kunitz, dominio Z derivado de Proteína A, dominio derivado de gamma B cristalina, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d, dominio SH2 derivado de Fyn, miniproteína y andamio estructural de dominio del tipo lectina de tipo C.

5. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la región de unión es capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en:

CD20, CD22, CD40, CD74, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, CDCP1, endoglina, proteína de activación de fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, CD133, gpA33, mucina, TAG-72, receptor transmembrana de proteína tirosina quinasa, anhidrasa carbónica IX, proteína de unión a folato, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido Lewis-Y2, VEGFR, Alfa Vbeta3, Alfa5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANK, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, beta-catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus de Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfa-fetoproteína, 17-A1, antígeno de tumor de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεRIα, galectina-9, PD-L1, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, CD193, TLR4, FcεRIα, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, CD11a-c, GITRL, molécula MHC Clase I, molécula MHC Clase II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2, CD11c, y cualquier fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores.

6. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la región de unión comprende o consiste en los aminoácidos 2-241 según cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-16.

7. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático carboxi terminal se selecciona del grupo que consiste en:

KDEL (SEQ ID NO: 34), HDEF (SEQ ID NO: 35), HDEL (SEQ ID NO: 36), RDEF (SEQ ID NO: 37), RDEL (SEQ ID NO: 38), WDEL (SEQ ID NO: 39), YDEL (SEQ ID NO: 40), HEEF (SEQ ID NO: 41), HEEL (SEQ ID NO: 42), KEEL (SEQ ID NO: 43), REEL (SEQ ID NO: 44), KAEI (SEQ ID NO: 45), KCEI (SEQ ID NO: 46), KFEL (SEQ ID NO: 47), KGEL (SEQ ID NO: 48), KHEL (SEQ ID NO: 49), KLEI (SEQ ID NO: 50), KNEI (SEQ ID NO: 51), KQEL (SEQ ID NO: 52), KREL (SEQ ID NO: 53), KSEL (SEQ ID NO: 54), KVEL (SEQ ID NO: 55), KWEL (SEQ ID NO: 56), KYEL (SEQ ID NO: 57), KEDL (SEQ ID NO: 58), KIEL (SEQ ID NO: 59), DKEL (SEQ ID NO: 60), FDEL (SEQ ID NO: 61), KDEF (SEQ ID NO: 62), KKEI (SEQ ID NO: 63), HADL (SEQ ID NO: 64), HAEI (SEQ ID NO: 65), HIEL (SEQ ID NO: 66), HNEL (SEQ ID NO: 67), HTEL (SEQ ID NO: 68), KTEL (SEQ ID NO: 69), HVEL (SEQ ID NO: 70), NDEL

(SEQ ID NO: 71), QDEL (SEQ ID NO: 72), REDL (SEQ ID NO: 73), RNEL (SEQ ID NO: 74), RTDL (SEQ ID NO: 75), RTEL (SEQ ID NO: 76), SDEL (SEQ ID NO: 77), TDEL (SEQ ID NO: 78), SKEL (SEQ ID NO: 79), STEL (SEQ ID NO: 80) y EDEL (SEQ ID NO: 81).

- 5 8. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en una secuencia que es al menos un 95% idéntica con:
(i) los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;
(ii) los aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;
10 (iii) los aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; o
(iv) los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3.
- 15 9. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la región efectora de la toxina Shiga comprende una mutación con relación a una subunidad A natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia la actividad enzimática de la región efectora de la toxina Shiga, la mutación seleccionada de al menos una eliminación, inserción o sustitución de residuo de aminoácido; en la que la subunidad A natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos según cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-3.
- 20 10. Proteína, según la reivindicación 9, en la que la mutación reduce o elimina la citotoxicidad de la región efectora de toxina Shiga.
- 25 11. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en:
(i) los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;
(ii) los aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;
(iii) los aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; o
(iv) los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3.
- 30 12. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que tras la administración de la proteína a una célula acoplada físicamente con dicha biomolécula diana extracelular, la proteína es capaz de causar la muerte de la célula;
opcionalmente en la que tras la administración de la proteína a una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente con dicha biomolécula diana extracelular, y una segunda población de células cuyos miembros no están acoplados físicamente con dicha biomolécula diana extracelular, el efecto citotóxico de la proteína a los miembros de dicha primera población de células con respecto a los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor.
- 35 13. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en forma de homomultímero o heteromultímero.
- 40 14. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en forma de sal o solvato farmacéuticamente aceptable.
- 45 15. Composición farmacéutica que comprende la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
16. Composición farmacéutica, según la reivindicación 15, en la que el al menos un portador farmacéuticamente aceptable incluye un disolvente, medio de dispersión, recubrimiento, tal como lecitina, agente antimicrobiano, agente isotónico o agente retardador de la absorción; opcionalmente en el que el agente antimicrobiano es un agente antibacteriano o antifúngico.
- 50 17. Composición de diagnóstico que comprende: la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y un agente promotor de la detección.
18. Kit que comprende:
(i) la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, la composición farmacéutica de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, o la composición de diagnóstico de la reivindicación 17; y
55 (ii) un reactivo adicional y/o dispositivo de administración farmacéutica.
19. Procedimiento *in vitro* para suministrar un material exógeno en una célula, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto una célula con la proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, la composición farmacéutica de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, o la composición de diagnóstico de la reivindicación 17, en el que dicha célula se acopla físicamente con la biomolécula diana extracelular unida por dicha proteína.
- 60 20. Procedimiento *in vitro* para eliminar una célula, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14.

21. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 15 o reivindicación 16, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección en un sujeto en necesidad de la misma.
- 5 22. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección que se selecciona del grupo que consiste en: cáncer, tumor, anormalidad de crecimiento, trastorno inmunitario e infección microbiana.
- 10 23. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, para usar, según la reivindicación 22, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza-cuello, cáncer hematológico, cáncer del tracto renal-urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer de útero, o
- 15 en la que el trastorno inmunitario se asocia con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedades relacionadas con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide,
- 20 esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa y vasculitis.
24. Proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, composición farmacéutica, según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, o una composición de diagnóstico, según la reivindicación 17, para usar en el diagnóstico, pronóstico o la caracterización *in vivo* de una enfermedad, trastorno o afección.
- 25 25. Uso de la proteína, según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, la composición farmacéutica de la reivindicación 15 o la reivindicación 16, o la composición de diagnóstico de la reivindicación 17, en el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad, trastorno o afección.

Figura 1. Dibujo esquemático de la arquitectura general de proteínas citotóxicas de ejemplo

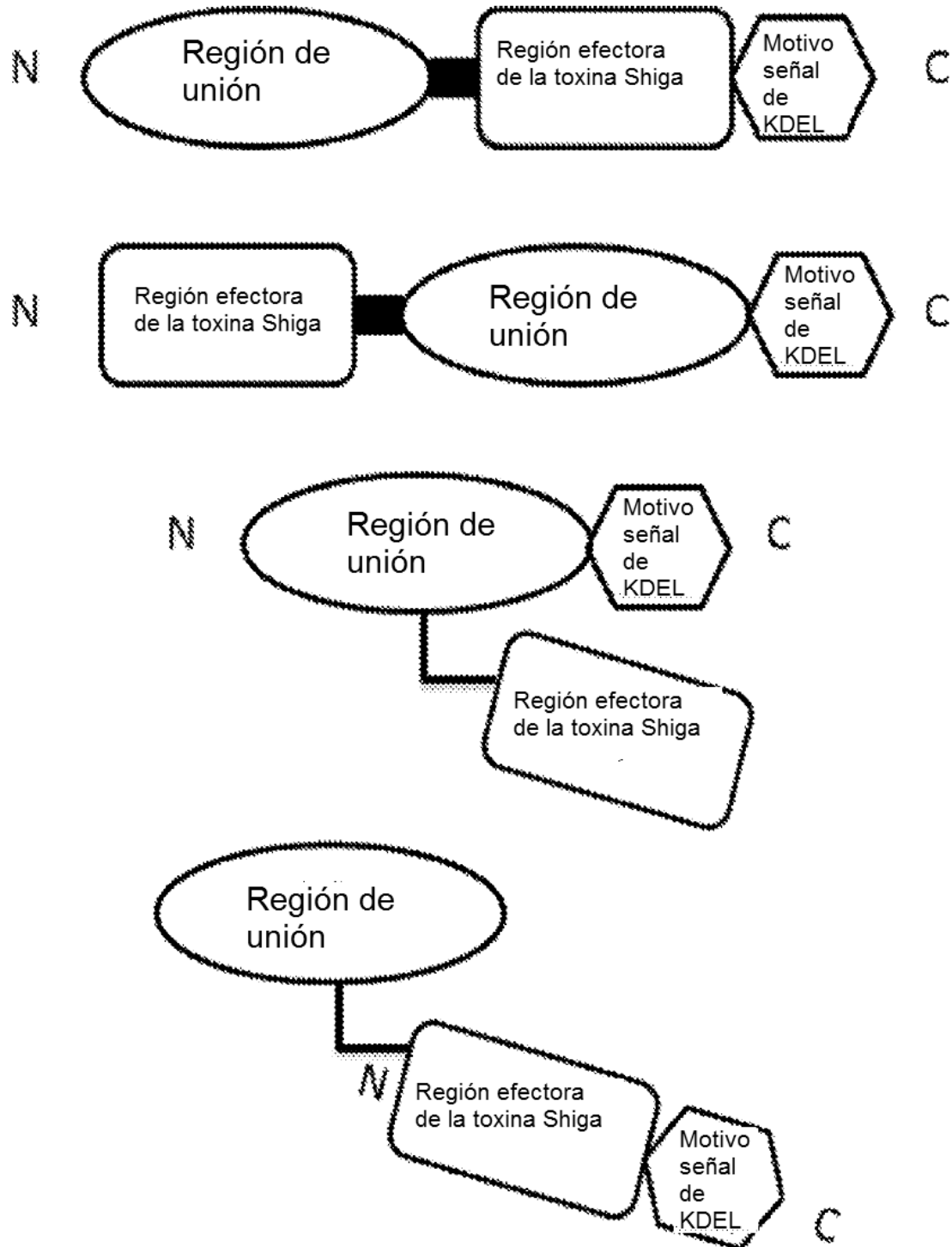


Figura 2. Adición de citotoxicidad dirigida mejorada con KDEL:
alfaHER2scFv::SLT-1A::KDEL mostró una citotoxicidad mejorada
 en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal
 de KDEL

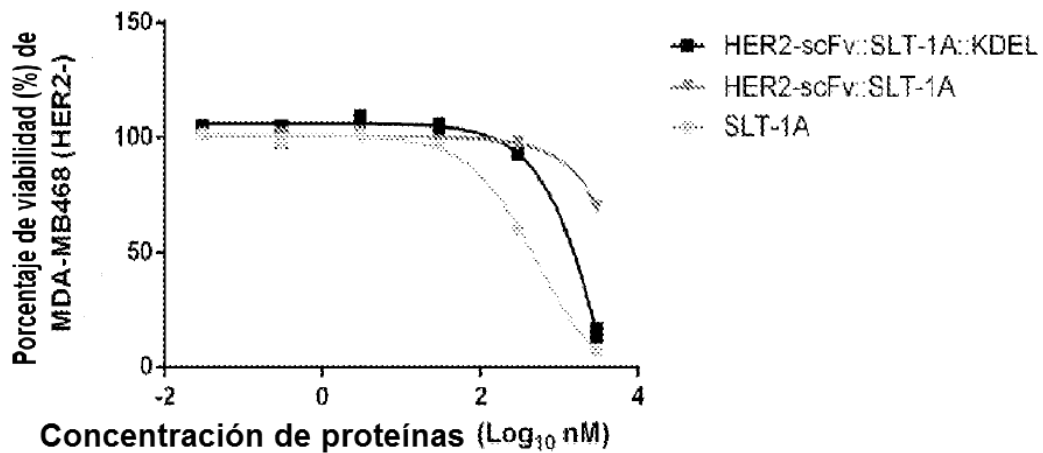
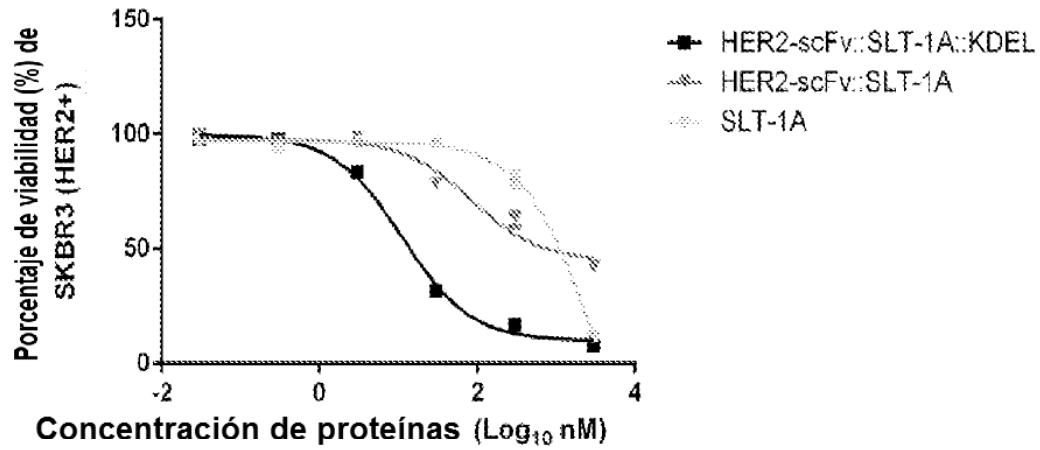
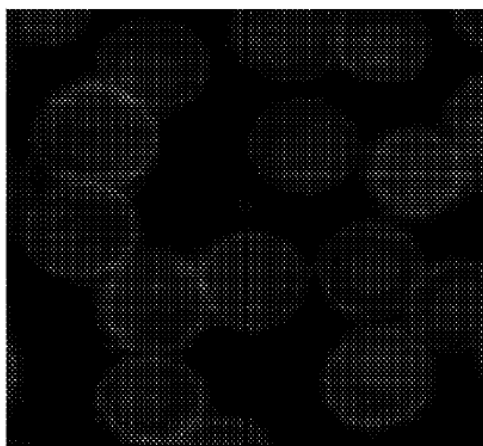


Figura 3. Entrada celular: Internalización celular similar de alfaHER2scFv::SLT-1A y la variante alfaHER2scFv::SLT-1A::KDEL que contiene KDEL carboxilo

αHER2scFv::SLT-1A



αHER2scFv::SLT-1A::KDEL

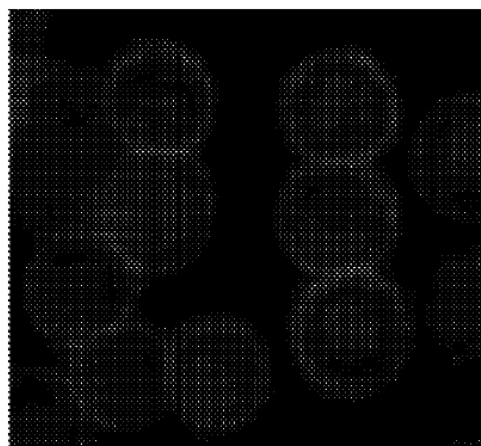


Figura 4. Adición de citotoxicidad dirigida mejorada con KDEL: alfaCD38scFv::SLT-1A::KDEL mostró una citotoxicidad mejorada en comparación con su predecesor que carecía del motivo señal de KDEL

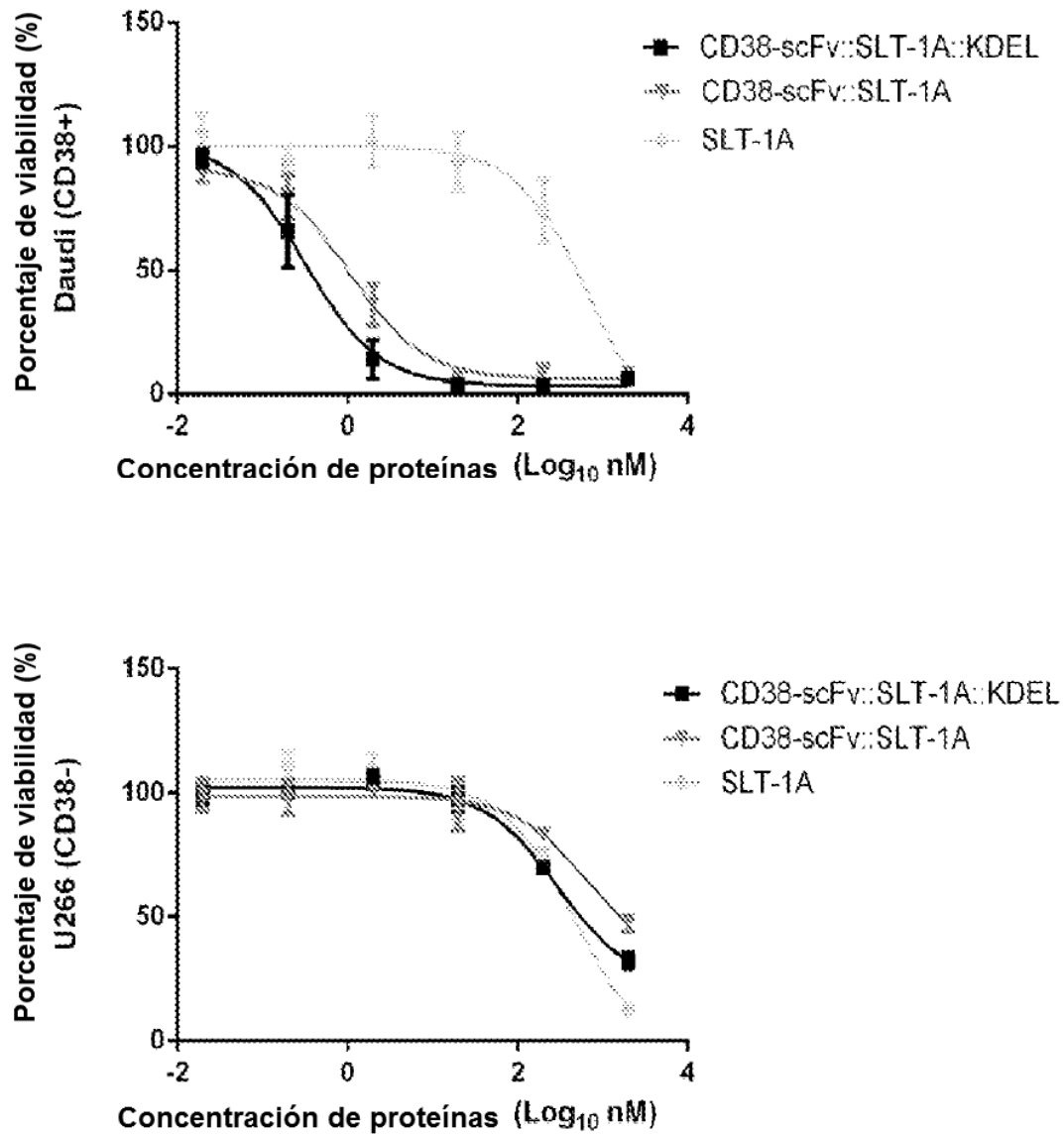


Figura 5. Adición de citotoxicidad dirigida mejorada con KDEL: α CD19scFv::SLT-1A::KDEL mostró citotoxicidad mejorada en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal de KDEL

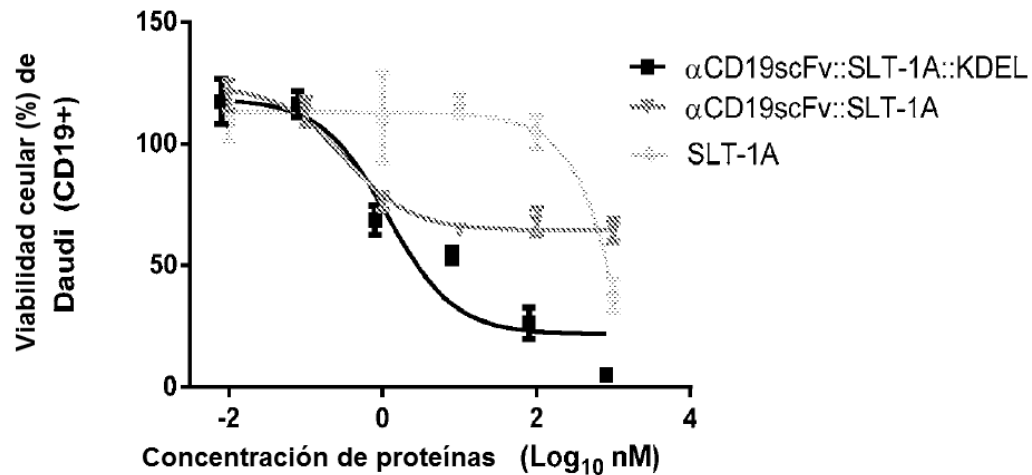


Figura 6. Adición de citotoxicidad dirigida mejorada con KDEL: α CD74scFv::SLT-1A::KDEL mostró citotoxicidad mejorada en comparación con su predecesor que carecía de un motivo señal de KDEL

