



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 844**

51 Int. Cl.:
C07K 14/245 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04785852 .7**

96 Fecha de presentación : **26.03.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1727827**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

54 Título: **Colección de mutantes de toxinas y métodos para su uso.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.09.2010

73 Titular/es: **Molecular Templates, Inc.**
111 W. Cooperative Way, Suite 201
Georgetown, Texas 78626, US

72 Inventor/es: **Gariepy, Jean y**
Wei, Xin

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Colección de mutantes de toxinas y métodos para su uso.

5 Antecedentes de la invención

Esta solicitud se refiere a colecciones de mutantes de toxinas, y a métodos para usar las mismas en el desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos contra tipos celulares específicos.

10 Las toxinas vegetales y bacterianas tienen una organización estructural con dos o más dominios o subunidades polipeptídicas responsables de distintas funciones, denominadas A y B. Las toxinas pueden denominarse toxinas AB_x donde x representa el número de subunidades B idénticas u homólogas en la toxina. Esta familia de toxinas relacionadas incluye ejemplos tales como las toxinas Shiga y de tipo Shiga, las enterotoxinas sensibles al calor de *E. coli*, la toxina del cólera, la toxina de la difteria, la toxina pertussis, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* 15 (Olsnes, S. y Sandvik, K. (1988) en *Immunotoxins* pp. 39-73, Kluwer Academic, Boston; Sandvik, K., Dubinina, E., Garred, O., *et al.* (1992) *Biochem. Soc. Trans.* 20:724) así como toxinas vegetales tales como ricina y abrina. En algunos casos las toxinas son heterómeras, en las que las cadenas B son en realidad entidades separadas que se conectan con la cadena tóxica A mediante un enlace no covalente. En otros casos, la toxina es monomérica, puesto que la cadena B forma parte de la misma proteína cuando la toxina se produce en la naturaleza.

20 Basándose en su capacidad para bloquear la síntesis de proteínas, las proteínas tales como las toxinas Shiga y de tipo Shiga, así como la ricina, abrina, gelonina, crotina, proteína antiviral de fitolaca americana, saporina, momordina, modicina, sarcina, toxina de la difteria y exotoxina A se han denominado proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP, del inglés "ribosome-inactivating proteins"). La potencia de las RIPs es extremadamente alta, habiéndose demostrado 25 que una molécula de la cadena A de la toxina de la difteria (Yamaizumi, *et al.* (1978) *Cell* 15:245-250) o de la cadena A de la ricina (Eiklid, *et al.* (1980) *Exp. Cell Res.* 126:321-326) es suficiente para destruir una célula eucariótica.

La Publicación de Patente Internacional N° WO99/40185 describe colecciones de toxinas mutantes en las que las mutaciones se introducen en el dominio de unión para alterar el tipo de células al que se suministran las especies tóxicas. Las nuevas proteínas se derivan mutando una subunidad de unión de la proteína citotóxica heterómera salvaje para 30 crear una colección de clones de microorganismos que producen proteínas mutantes que a continuación se someten a escrutinio sobre la base de su capacidad para unirse y destruir específicamente un tipo celular diana.

La Patente de los EEUU N° 5,552,144 describe una variante de la toxina II de tipo Shigella en la que se introduce 35 una mutación en la cadena A en la posición 167 para cambiar el aminoácido en esta posición por uno con diferente carga. Esto dio como resultado una toxina con menor actividad enzimática asociada con la toxicidad.

La Patente de los EEUU N° 6,593,132 describe proteínas tóxicas recombinantes que son tóxicas específicamente para células enfermas, pero que no dependen para su especificidad de acción de un componente específico de unión 40 a la célula. Las proteínas recombinantes de la patente '132 tienen una cadena A de una toxina de tipo ricina enlazada a una cadena B mediante una secuencia de enlace sintética que puede ser escindida específicamente por una proteasa localizada en las células o tejidos afectados por una enfermedad específica para liberar la cadena tóxica A, inhibiendo o destruyendo así selectivamente las células o tejidos enfermos.

45 La Patente de los EEUU N° 6,649,742 describía proteínas inactivadoras de ribosomas (RIPs) de Tipo I y análogos de RIPs que tienen una cisteína disponible para formar un puente disulfuro con moléculas diana. Las RIPs y los análogos de RIPs se usan como componentes de agentes terapéuticos citotóxicos para eliminar selectivamente cualquier tipo celular al que se dirija el componente RIP mediante la capacidad de unión específica del segundo componente del agente.

50 Compendio de la invención

La presente proporciona colecciones combinatorias de proteínas que comprenden una pluralidad de especies proteicas, en las que cada especie proteica comprende una cadena A de una proteína tóxica heterómera AB_x en la que se 55 ha introducido un inserto. Según la invención, el inserto es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos variable que tiene una longitud de 2 o más restos de aminoácido, por ejemplo de 3 a 200 restos de aminoácido, y el inserto se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. El resultado de la introducción del inserto crea un dominio de unión artificial dentro de la cadena A, de tal forma que la cadena A desarrolla una especificidad tóxica que es independiente y diferente de la especificidad normal asociada con los dominios de unión de las cadenas 60 B. El escrutinio de la colección permite la selección e identificación de toxinas mutantes que son específicas para tipos celulares diferentes, incluyendo tipos de células cancerosas. En una realización de la invención, la colección combinatoria comprende especies proteicas que se forman introduciendo el inserto en la cadena A de una toxina I de tipo Shiga, por ejemplo en la región entre los aminoácidos 242 y 261, como se define con referencia a la Sec. ID N° 1.

65 La invención proporciona también una colección combinatoria de expresión que comprende una pluralidad de especies de sistemas de expresión, expresando cada especie una especie proteica que comprende una cadena A de una proteína tóxica heterómera AB_x en la que se ha introducido el inserto como se describe anteriormente. La expresión

de proteínas a partir de la colección combinatoria de expresión da como resultado la formación de una colección combinatoria de proteínas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición para tratar melanoma, y métodos para usar tal composición. La composición comprende una especie proteica que comprende una cadena A de una proteína tóxica heterómera AB_x en la que un polipéptido que tiene una longitud de 2 o más restos de aminoácido, por ejemplo de 3 a 200 restos de aminoácido, se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. El inserto se selecciona de tal forma que la especie proteica tenga actividad tóxica frente a las células del melanoma. La especie proteica se usa en el tratamiento del melanoma administrándola al paciente diagnosticado con melanoma en una cantidad suficiente como para producir la reducción del número de células de melanoma vivas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición para tratar otros tipos de cáncer. La composición comprende una especie proteica que comprende una cadena A de una proteína tóxica heterómera AB_x en la que un polipéptido que tiene una longitud de 2 o más restos de aminoácido, por ejemplo de 3 a 200 restos de aminoácido, se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. El inserto se selecciona de tal forma que la especie proteica tenga actividad tóxica frente a las células cancerosas. En una realización específica, el inserto se selecciona para unirse a receptores MUC-1. La especie proteica se usa en el tratamiento del melanoma administrándola al paciente diagnosticado con melanoma en una cantidad suficiente como para producir la reducción del número de células de melanoma vivas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para identificar ligandos que se unen a dianas/receptores específicos, tales como los marcadores tumorales que se sabe que existen en las células cancerosas. En este método, la toxina de la colección combinatoria sirve como reportero, y una colección combinatoria de proteínas según la invención se somete a escrutinio frente a células que se sabe que poseen la diana/receptor. Las proteínas que presentan toxicidad frente a las células se evalúan para determinar la secuencia de la región insertada. Los péptidos con esta secuencia pueden usarse seguidamente, en combinación con una toxina u otras moléculas, para dirigir compuestos a las células que poseen la diana/receptor.

En otro aspecto adicional más de la invención, se proporciona un método para identificar sustancias tóxicas específicas para un marcador celular conocido. En esta realización de la invención, la toxina no necesita servir como reportero. Por tanto, las células que tienen el marcador, o una diana/receptor aislado, cuando está disponible, se exponen a la colección combinatoria de proteínas. En realizaciones preferidas, las células, o la diana/receptor aislado, se inmovilizan sobre un soporte sólido, tal como en pocillos de plástico. Las proteínas capturadas de la colección se someten seguidamente a un nuevo escrutinio para confirmar su toxicidad y especificidad hacia las células que expresan la diana/receptor y su idoneidad para usarse como agente terapéutico.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático que representa los dominios A1 y A2 de SLT-1. La cadena A está compuesta por 293 aminoácidos. La cadena es escindida por furina para producir un fragmento catalítico A1 y una cola C-terminal A2 asociada de manera no covalente al pentámero B. Un bucle sensible a proteasa (área rallada) queda definido por los dos únicos restos de cisteína en la cadena A (Cys 242 y 261). Tyr77, Glu167, Arg170 y Trp203 representan restos cruciales para la actividad catalítica del dominio A1 (flechas).

La Fig. 2A es una representación esquemática de la cadena A de SLT-1 (1- 293) con el epítipo de MUC1 asociado a cáncer de mama PDTRPAP (secuencia control reconocida por el mAb Onc M27) insertado entre los restos 245 y 246 y una secuencia etiqueta de 6 histidinas en su extremo N-terminal.

La Fig. 2B es una representación de la construcción de nuestra colección de cadenas A de SLT-1-tripéptidos, donde las tres posiciones clave del epítipo de MUC1 reconocidas por el mAB Onc M27 se combinaron aleatoriamente (región XXX). La colección de tripéptidos se insertó en una región en forma de bucle de la cadena A creado naturalmente por la presencia de un puente disulfuro entre Cys 242 y Cys 261.

La Fig. 3 muestra un conjunto de datos de ELISA representativos obtenidos de un escrutinio de 96 variantes distintas con una única cadena A de nuestra colección de cadenas A de SLT-1-tripéptidos con mAB Onc M27. La variante de toxina #41 (Tablas 1 y 2) presentó una fuerte señal en el ensayo ELISA y tenía el epítipo esperado.

La Fig. 4 muestra un diagrama esquemático de un segmento al azar de 7 aminoácidos insertado entre los restos 245 y 246 de la cadena A.

La Fig. 5 muestra los resultados de los ensayos con siete variantes de toxina que se identificaron como destructores repetitivos de la línea de células de melanoma humano 518A2. El eje de abscisas representa el logaritmo de la concentración de toxina usada para tratar las células y el eje de ordenadas representa el porcentaje observado de células que son viables después de 48 horas. Los triángulos rellenos representan el efecto de la toxina salvaje sobre las células 518A2, mientras que las variantes de la cadena A más eficaces se denominaron SAM#3 (cuadrados sin relleno) y SAM#5 (símbolos X).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una colección combinatoria de proteínas que comprende una pluralidad de especies proteicas, comprendiendo cada especie proteica una cadena A de una proteína tóxica heterómera en la que se ha introducido un inserto. El inserto es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos variable que tiene una longitud de 2 o más restos de aminoácido, por ejemplo de 3 a 200 restos de aminoácido; y se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. La colección proporciona un conjunto de especies proteicas que pueden someterse a escrutinio para seleccionar proteínas individuales que sean tóxicas frente a tipos celulares específicos, tales como tipos específicos de células cancerosas. Las especies proteicas así seleccionadas se usan adecuadamente en el tratamiento del cáncer.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones de esta solicitud, el término “colección combinatoria” se refiere a una mezcla de especies, cada una de las cuales tiene una porción común y una porción variable. En el caso de una “colección combinatoria de proteínas”, cada una de las especies es una proteína o péptido, y las porciones comunes y las porciones variables son cada una de ellas secuencias de aminoácidos. En el caso de una colección combinatoria de expresión, las especies son microorganismos, vectores de expresión o polinucleótidos que, al ser expresados, producen proteínas o péptidos que tienen porciones comunes y porciones variables. En este caso, las porciones comunes y las porciones variables son cada una de ellas secuencias de nucleótidos. Puesto que el propósito de la colección combinatoria es proporcionar múltiples variantes con el fin de ser sometidas a escrutinio, la colección combinatoria contiene preferiblemente al menos 100 especies distintas de unidades proteicas o de expresión, más preferiblemente al menos 1000 especies distintas.

Tal como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones de esta solicitud, el término “proteína tóxica heterómera” se refiere a la clase de proteínas tóxicas con la característica de organización común de ser heterómeras por naturaleza con dos o más dominios o subunidades polipeptídicas responsables de distintas funciones (Merritt, E.A., y HoI, W.G.J. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:165-1). En tales proteínas, las dos, o más, subunidades o dominios podrían denominarse A y B, y las toxinas AB_x donde x representa el número de subunidades B idénticas u homólogas en la toxina. Esta familia de toxinas relacionadas incluye ejemplos tales como las toxinas Shiga y de tipo Shiga, las enterotoxinas sensibles al calor de *E. coli*, la toxina del cólera, la toxina de la difteria, la toxina pertussis, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* así como toxinas vegetales tales como ricina y abrina. Basándose en su capacidad para bloquear la síntesis de proteínas, las proteínas tales como las toxinas Shiga y de tipo Shiga, así como la ricina, abrina, gelonina, crotina, proteína antiviral de fitolaca americana, saporina, momordina, modicina, sarcina, toxina de la difteria y exotoxina A se han denominado proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP). En estas proteínas tóxicas heterómeras existentes en la naturaleza, la cadena A es la porción tóxica, mientras que las cadenas B forman un resto de unión que se une a un receptor en una célula susceptible a la toxina, suministrándose de esta forma a la célula la cadena A.

Un ejemplo específico de la cadena A de una proteína tóxica heterómera es la cadena A de SLT-1 que tiene la secuencia proporcionada como Sec ID N° 1. La cadena A de SLT-1 comprende 293 aminoácidos, extendiéndose el dominio enzimático (tóxico) del resto 1 al 239. Un bucle sensible a proteasa que abarca los restos 242 a 261 queda normalmente expuesto, y es un sitio adecuado para insertar una secuencia peptídica.

SLT-1 es una proteína inactivadora de ribosomas de tipo II producida por una cepa patogénica de *Escherichia coli* (0157:H7) (24). SLT-1 es un complejo AB₅ de aproximadamente 70 kD (O'Brien, A. D, y Holmes, R. K. (1987) “Shiga and Shiga-like toxins”. Microbiol Rev 51, 206-220). La única subunidad A catalítica de 32 kD está asociada de manera no covalente con un pentámero de cinco subunidades B idénticas de 7,7 kD. El pentámero de subunidades B reconoce al glicolípido globotriaosilceramida (también conocido como CD77 ó Gb3) en la superficie de las células diana (Lingwood, C. A. (1993) “Verotoxins and their glycolipid receptors”. Adv Lipid Res 25, 189-211; Jacewicz, *et al.* (1986) “Pathogenesis of shigella diarrhea: XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide”. J Exp Med 163, 1391-1404). Un bucle sensible a proteasa situado entre Cys242 y Cys261 en el extremo C-terminal de la cadena A se escinde por medio de la furina durante la ruta celular (Fig. 1). La cadena A permanece asociada con su pentámero de subunidades B debido a un enlace disulfuro intracatenario entre Cys242 y Cys261 a medida que viaja hacia el lumen del retículo endoplasmático (Sandvig, *et al.* (1989) “Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1”. J Cell Biol 108, 1331-1343;32. Garred, *et al.* (1995) “Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of Shiga toxin and toxin mutants”. Exp Cell Res: 218, 39-49). El puente disulfuro es finalmente reducido en el lumen del retículo endoplasmático y la cadena A1 (primeros 251 aa) se libera y se retrotransloca subsiguientemente al citosol donde inactiva a los ribosomas (O'Brien, *et al.* (1992) “Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis”. Curr Top Microbiol Immunol 180,65-94). Más específicamente, la cadena A de SLT-1 es una N-glicosidasa que escinde catalíticamente un nucleótido de adenina específico (4324) del rRNA 28 S (Brigotti, *et al.* (1997) “The RNA-N-glycosidase activity of Shiga-like toxin I: kinetic parameters of the native and activated toxin”. Toxicon 35, 1431-1437.). Este suceso conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas impidiendo la unión de los aminoacil-tRNAs al ribosoma y deteniendo la elongación proteica. Estudios de mutagénesis, así como los análisis estructurales realizados sobre las cadenas A de ST y ricina han definido los restos clave conservados implicados en la actividad catalítica (Deresiewicz, *et al.* (1992) “Mutations affecting the activity of the Shiga-like toxin I A-chain”. Biochemistry 31, 3272-3280; Ready, *et al.* (1991) “Site-directed mutagenesis of ricin A chain and implications for the mechanism of action”. Proteins 10, 270-278). Los restos cruciales para la actividad catalítica de SLT-1 son la tirosina 77, el ácido glutámico 167, la arginina 170 y el triptófano 203 (Hovde, *et al.* (1988) “Evidence that glutamic acid

167 is an active-site residue of Shiga-like toxin 1". Proc Natl Acad Sci USA. 85, 2568-2572; Yamasaki, *et al.* (1991) "Importance of arginine at position 170 of the A subunit of Vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity". Microb Pathog 11, 1-9). Además, la unión de la toxina a la superficie celular es crítica para su introducción dentro de la célula y, por tanto, para su actividad tóxica. Debido a esto, la cadena A en solitario no es

Además de la cadena A de SLT-1, pueden usarse también otras toxinas para formar colecciones y composiciones según la invención, y pueden usarse en los métodos de la invención. Específicamente, pueden usarse las toxinas Shiga y otras de tipo Shiga, así como ricina, abrina, gelonina, crotina, proteína antiviral de fitolaca americana, saporina, momordina, modicina, sarcina, toxina de la difteria y exotoxina A, y otras proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) funcionalmente relacionadas.

Con el fin de preparar la colección combinatoria de la invención, se insertan en este bucle sensible a proteasa secuencias cortas de aminoácidos de al menos 2 aminoácidos, por ejemplo de 3 a 200 aminoácidos de longitud. El número de aminoácidos en el inserto define el número de posibles variantes al azar que puede haber en la colección. Por ejemplo, cuando el número de aminoácidos en el inserto es 3, el número máximo de variantes es 20^3 ó 8000 variantes. Insertos más largos proporcionan un correspondiente mayor número de posibles variantes.

Como alternativa a usar insertos con secuencias puramente al azar, pueden diseñarse insertos basados en un molde conocido. Por ejemplo, como se describe más abajo en el contexto de Muc-1, para identificar un inserto que asegure la optimización de las propiedades tóxicas de la construcción proteica, pueden usarse variaciones de una secuencia que se sabe que proporciona propiedades de unión a un receptor para un tipo celular en particular. Esta misma optimización puede realizarse en una secuencia individual aislada por escrutinio de una colección combinatoria mayor. Se apreciará, sin embargo, que el inserto en los ensayos de la prueba de concepto del Ejemplo 1 usa un inserto que es la diana/receptor, mientras que en el caso actual el inserto se basaría en la secuencia de un ligando conocido, a ser optimizado para conseguir máxima eficacia y especificidad.

Este abordaje, en el que un tipo de receptor específico conocido es la diana, ilustra un aspecto adicional de la invención, a saber, un método para identificar ligandos peptídicos que se unen a dianas/receptores específicos, tales como marcadores tumorales que se sabe que existen en las células cancerosas. En este método, una colección combinatoria de proteínas según la invención se somete a escrutinio frente a células que se sabe que poseen la diana/receptor. La toxina sirve como reportero, de tal forma que las proteínas que demuestran ser tóxicas para las células se evalúan para determinar la secuencia de la región insertada. Los péptidos de esta secuencia pueden usarse seguidamente, en combinación con una toxina u otras moléculas, para dirigir compuestos a las células que poseen la diana/receptor. Otros péptidos restantes de la secuencia de la región insertada pueden ser apropiados para confirmar que son un ligando para la diana/receptor específico, y no para algunos otros receptores en el tipo celular. Esto puede realizarse usando ensayos de unión con receptor aislado, cuando esté disponible.

La invención proporciona también un método para identificar sustancias tóxicas específicas para un marcador celular conocido, y particularmente marcadores que están disponibles de forma aislada. En esta realización de la invención, la toxina no necesita servir como reportero. Así, las células que tienen el marcador, o una diana/receptor aislado, cuando esté disponible, se exponen a la colección combinatoria de proteínas. En realizaciones preferidas, las células o la diana/receptor aislado se inmovilizan sobre un soporte sólido, tal como en pocillos de plástico. Las proteínas capturadas de la colección se someten a continuación nuevamente a escrutinio frente a las células para confirmar su toxicidad y especificidad hacia las células que expresan la diana/receptor y su idoneidad para usarse como agente terapéutico. Este método puede usarse para identificar toxinas con insertos de unión específicos para cualquier marcador tumoral o receptor celular, incluyendo sin limitaciones marcadores tumorales tales como las mucinas tales como MUC-1 y sus glicoformas, Her-2, Her2-Neu, marcadores de tirosina quinasa, EGFR, GD2 y GD3.

Por tanto, según este aspecto específico de la invención, se proporciona un método para aislar una toxina específica para una diana/receptor conocido, que comprende los pasos de:

(a) exponer la diana/receptor a una colección combinatoria de proteínas que comprende una pluralidad de especies proteicas, comprendiendo cada especie proteica una cadena A de una proteína tóxica en la que se ha introducido un inserto, en el que,

el inserto es un polipéptido con una secuencia variable de aminoácidos que tiene una longitud de al menos 2 restos de aminoácido; y

el inserto se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A; y

(b) aislar al menos una especie proteica de la colección combinatoria de proteínas capturada por unión a la diana/receptor. Tal como se usa en la memoria descriptiva y reivindicaciones de la presente, el término "aislar" se refiere a cualquier mecanismo para obtener una composición que contenga la proteína separada del entorno en el que se expresa, en una forma adecuada para análisis adicionales. Esto incluiría la liberación de la diana/receptor después de la captura (por ejemplo por exposición a un agente de unión competitivo) o el aislamiento de un cultivo de un clon que expresara la proteína hallada como capturada. El método puede comprender además el paso de someter a escrutinio la proteína aislada frente a las células que expresan la diana/receptor, para confirmar su toxicidad hacia las células que

expresan la diana/receptor. Los procedimientos adecuados para este escrutinio se describen en el Ejemplo 3. Como se ha señalado anteriormente, en este método, la diana/receptor puede ser una diana/receptor purificado y puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. La diana/receptor puede estar también en la superficie de las células, que puede inmovilizarse. Cuando la diana/receptor está en la superficie de las células, la toxina puede servir como reportero, y la muerte de las células es indicativa de la unión al receptor.

Nuestra experiencia en la construcción de colecciones de SLT-1 nos ha señalado varias cuestiones prácticas que se consideran apropiadamente en la selección de una proteína molde para construir colecciones combinatorias. Un factor importante es elegir una proteína de cadena sencilla, preferiblemente una proteína bacteriana de menos de 300 aminoácidos (si las colecciones van a expresarse en procariotas). El uso de una toxina más pequeña aumenta su potencial para penetrar en los tumores sólidos y disminuye su inmunogenicidad. En segundo lugar, la proteína molde debería replegarse espontáneamente en solución en su forma activa, de manera que haya una necesidad mínima de las chaperonas del hospedante. Deberían evitarse, por ejemplo, estructuras que contienen múltiples restos de cisteína, implicados normalmente en los puentes disulfuro. Además, una proteína de cadena sencilla, y no un complejo de múltiples subunidades, puede ser más fácilmente exportado desde la bacteria. En tercer lugar, la proteína molde debería poseer una actividad enzimática, que puede medirse fácilmente para confirmar el plegamiento apropiado de las variantes peptídicas que contengan mutaciones dirigidas sencillas o múltiples. En cuarto lugar, debería incorporarse un abordaje simple de escrutinio al diseño de las colecciones combinatorias. Tales búsquedas deberían ser susceptibles de permitir el uso de métodos de escrutinio de alto rendimiento. La cadena A catalítica de SLT-1 (restos 1 a 293) cumple estos criterios porque es una cadena sencilla que no tiene ninguna función de unión a receptores conocida, y que tiene una estructura y sitio catalítico bien definidos.

Un aspecto adicional de la invención es una colección combinatoria de expresión que comprende una pluralidad de especies de sistemas de expresión. Cada especie de la colección de expresión expresa una especie proteica que comprende una cadena A de una proteína tóxica heterómera en la que se ha introducido un inserto. El inserto es un polipéptido con una secuencia de aminoácidos variable que tiene una longitud de 2 o más restos de aminoácido, por ejemplo de 3 a 200 restos de aminoácido, y se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. Los sistemas de expresión adecuados incluyen plásmidos y vectores virales.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

“Prueba de concepto”: diseño y evaluación (mining) de una colección prototípica de cadenas A-tripeptidos

Originalmente creamos una colección de tripeptidos simple insertados en el bucle sensible a proteasa del extremo C-terminal de la cadena A de STL-1 (Figs. 2A y B). Esta región en forma de bucle de la cadena A está restringida de forma natural debido a la presencia de un único puente disulfuro que forma un puente desde Cys242 a Cys261. Puede calcularse, por tanto, que la diversidad máxima de esta colección será de 20^3 ó 8000 permutaciones de una secuencia tripeptídica. Como “prueba de concepto” de que las colecciones de cadenas A pueden someterse a escrutinio fácilmente para detectar la actividad de unión a un nuevo receptor, seleccionamos más de 3000 colonias de esta colección de cadenas A-tripeptidos y purificamos la toxina mutante producida por cada clon. En este estudio, nos dimos cuenta enseguida de que el nivel de expresión del mutante de la cadena A aumentaba espectacularmente cuando se expresaba en presencia de la subunidad B de SLT-1 salvaje. Por tanto, las formas mutantes de la cadena A se expresaron y purificaron inicialmente como variantes de la toxina AB5. Puesto que todas las subunidades A llevan una secuencia etiqueta de poli- His para su purificación, resulta relativamente fácil eliminar la subunidad B con agentes desnaturalizantes (por ejemplo urea) y recuperar la cadena A en columnas o perlas de afinidad con metales. Las transferencias Western realizadas con clones de bacterias seleccionados al azar indicaron que más del 70% de estas colonias producían cantidades considerables de estos mutantes de la cadena A.

Estas variantes de toxina se dispusieron seguidamente revistiendo pocillos individuales en placas de 96 pocillos y se sometieron a escrutinio mediante ELISA sobre la base de su capacidad para unirse al anticuerpo monoclonal Onc M27 (Linsley, *et al.* (1988) “Monoclonal antibodies reactive with mucin glycoproteins found in sera from breast cancer patients”. *Cancer Res* 48, 2138-2148), dirigidos frente al bien caracterizado epítipo tripeptídico de cáncer de mama Thr-Arg-Pro de la repetición en tándem de MUC1 humano (Gendler, *et al.* (1988) “A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats”. *J Biol Chem* 263, 12820-12823; Girling, *et al.* (1989) “A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas”. *Int J Cancer* 43, 1072-1076). Tal como se muestra en las Tablas 1 y 2, la mayoría de los mutantes de la cadena A no codificaban el inserto tripeptídico que era complementario al epítipo diana de Onc M27, ni eran reconocidos por el anticuerpo. Sin embargo, en dos ocasiones, una variante de toxina que llevaba el epítipo exacto (Tabla 1, Fig. 3) presentó una fuerte señal en el ensayo de ELISA, comparable a la observada con nuestra cadena A de control que llevaba el epítipo tripeptídico de MUC1, y tenía la secuencia del epítipo esperada en su región tripeptídica al azar. En la Fig. 3 se presenta un conjunto de datos de ELISA típico para 96 mutantes de la cadena A, subrayando el hecho de que la mayoría de los mutantes de la cadena A no reconocían el mAb Onc M27 excepto una variante de la cadena A (mutante #41 en las Tablas 1 y 2). Estos resultados establecieron claramente que las colecciones de cadenas A pueden construirse fácilmente y someterse a escrutinio para encontrar variantes de la toxina capaces de dirigirse específicamente a un receptor dado, en este caso un sitio de combinación con antígeno.

Ejemplo 2

Preparación de una Colección Combinatoria de A de SLT-1-Heptapéptidos

La diversidad de las colecciones representa un parámetro crucial en el escrutinio de colecciones combinatorias para buscar ligandos capaces de unirse específicamente y con alta afinidad a una diana en particular. La colección de cadenas A de SLT-1-tripéptidos descrita en el Ejemplo 1 tiene una diversidad máxima de 20^3 ó 8000 cadenas A mutadas posibles. Este repertorio de muestras es pequeño pero resultó útil en la elaboración de mapas de un epítipo tripeptídico para establecer nuestra prueba de concepto. Una colección de siete restos (20^7 ó $1,3 \times 10^9$ posibles mutantes) representa un nivel de diversidad mínimo más típico utilizado normalmente en el diseño de colecciones de expresión de fagos así como de péptidos sintéticos. Por tanto, como punto de partida, construimos una colección de cadenas A de SLT-1 con una secuencia larga de 7 aminoácidos al azar insertada en su extremo C-terminal. Esta colección se instaló en el bucle sensible a proteasa de la cadena A, una región en forma de bucle restringida naturalmente por un puente disulfuro. Esta colección proporcionó suficiente diversidad para asegurar que pueden identificarse variantes de toxina de cadena A que se dirigen a receptores interiorizados nuevos o conocidos en células cancerosas. Todos los elementos de esta colección (así como todas las otras colecciones propuestas) contienen una secuencia etiqueta de histidinas N-terminal para purificar rápidamente los mutantes de la cadena A. La colección (Fig. 4) se generó usando una estrategia de PCR con mega-cebadores (Sarkar G., y Sommers S., (1990)) "The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis". Biotechniques 8, 404-407). La estrategia del mega-cebador es ampliamente utilizada para introducir mutaciones en una secuencia diana de DNA, por medio de dos rondas de PCR que usan dos cebadores flanqueantes y un cebador interno mutagénico. La descripción del diseño de la colección para la colección de cadenas A de SLT-1-heptapéptidos servirá como ejemplo para otras colecciones futuras de cadenas A únicas. La colección de cadenas A de SLT-1-heptapéptidos (Fig. 5) lleva una inserción al azar de 7 aminoácidos entre los aminoácidos 245 y 246 de la cadena A, sitio idéntico al usado para construir nuestra colección de cadenas A de SLT-1-tripéptidos (Tablas 1, 2, Fig. 3). Brevemente, dos cebadores flanqueantes A (GTT ACT GTG ACA GCT GAA GCT TTA CGT TTT CG (Sec. ID N° 2) y B (GAG AAG AAG AGA CTG CAG ATT CCA TCT GTT G (Sec. ID N° 3) que portaban los sitios de restricción HindIII y PstI, respectivamente, se reasociaron en los extremos 5' y 3' del operón SLT-1. Se sintetizó una colección de oligonucleótidos F que contenía los siete aminoácidos al azar (NNS) así como una larga secuencia complementaria para reasociarse con el molde. En la síntesis de oligonucleótidos al azar, la representación relativa de cada aminoácido se mejoró restringiendo la tercera posición de cada codón a G ó T (Noren, K. A., y Noren, C. J. (2001) "Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries". Methods 23, 169-178). Este tipo de restricción reduce la complejidad global de las secuencias de DNA así como la discrepancia de codificación entre los restos (Reidhaar-Olson, *et al.* (1991) "Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotide cassettes". Methods Enzymol 208, 564-586). Esta estrategia minimiza también la aparición de codones de terminación (TAA y TGA), mientras que el codón de terminación (TAG) se elimina usando una cepa bacteriana supE, que especifica la inserción de un resto de Gln cuando se traducen codones TAG. La primera reacción de PCR se realizó usando los cebadores A y F y el producto resultante se purificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Este producto sirvió a continuación como mega-cebador con el cebador B para una segunda reacción de PCR para amplificar el DNA al azar. El DNA final de la colección (producto de PCR) se digirió seguidamente con HindIII y PstI y se clonó en la cadena principal del vector de expresión pECHE9a (MTI, Toronto). El vector pECHE resultante se utilizó subsiguientemente para transformar la cepa de *E. coli* JM101 y se seleccionaron colonias bacterianas aisladas, se lisaron y los sobrenadantes se analizaron para detectar la expresión de toxinas de cadena A únicas o se dispusieron en una capa sobre células cancerosas y se sometieron a escrutinio usando SRB (sulforodamina B) para ensayar la citotoxicidad celular.

Ejemplo 3

Evaluación (mining) de la colección combinatoria formada por A de SLT-1- heptapéptidos frente a líneas de células cancerosas usando un ensayo de citotoxicidad

Sometimos a escrutinio nuestra colección formada por A de SLT-1-heptapéptidos usando la función citotóxica de la cadena A como señal reportera. La citotoxicidad es una propiedad a medir que proporciona más información que la unión a un receptor, ya que implica que la toxina es interiorizada, procesada y suministrada cerca de los ribosomas, un suceso que ocurre claramente en múltiples pasos. El ensayo de citotoxicidad se realizó esencialmente como se ha descrito previamente (Bray, *et al.* (2001) "Probing the surface of eukaryotic cells using combinatorial toxin libraries". Current Biology 11, 697-701). Brevemente, la estrategia para someter a escrutinio todas nuestras colecciones de cadenas A se basó en los siguientes principios. Se cultivaron líneas de células cancerosas establecidas tales como SK-BR-3 (mama humano), CAMA-1 (mama humano), 518A2 (melanoma humano), PC3 (próstata humano) y B16 (melanoma murino) en placas de 96 pocillos y se usaron como dianas en las primeras etapas del escrutinio. Estas líneas celulares se seleccionaron inicialmente para nuestras búsquedas de colecciones de holotoxinas (Bray, *ut supra*) basándose en su adherencia (plástico), sus propiedades de tinción según la viabilidad de las células (SRB) en un montaje de escrutinio de alto rendimiento, así como en su falta de receptor y sensibilidad hacia SLT-1 nativa (para asegurar un nivel reducido de falsos positivos). Se seleccionaron colonias bacterianas aisladas de cada colección y se cultivaron en placas de 96 pocillos profundos. Se recogieron las células, se lisaron y sus lisados se aclararon. Puesto que todas las variantes de la cadena A de SLT-1 expresadas tienen una secuencia etiqueta de 6 histidinas en su extremo N-terminal, se purificó cada una de ellas a partir de su lisado usando perlas de afinidad con níquel (en formato de 96 pocillos) y se dispusieron en capa sobre las células diana. Las placas que contenían las células diana tratadas con las variantes de la cadena A

se incubaron seguidamente a 37°C durante 48 horas, y a continuación se procedió a la fijación y tinción con Sulforodamina B (SRB). El ensayo con SRB es un ensayo de indicadores colorimétricos que cuantifica las células viables tiñendo su contenido proteico celular (Skehan, *et al.*, (1990) "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening". J Natl Cancer Inst 82, 1107-1112.). El ensayo con SRB ha sido adoptado por NCI/NIH para su escrutinio de alto rendimiento de candidatos a fármacos sobre líneas de células cancerosas. Los ensayos de viabilidad se repitieron con cualquier extracto bacteriano que conducía a la muerte celular. Se realizó una primera ronda de escrutinio sobre más de 5000 clones bacterianos (equivalentes a 5000 toxinas de cadena A distintas) y se identificaron 7 variantes de toxina como destructores repetitivos de la línea celular de melanoma humano 518A2 (Fig. 5). El eje de abscisas representa el logaritmo de la concentración de toxina usado para tratar las células y el eje de ordenadas representa el porcentaje observado de células que son viables después de 48 horas. Los triángulos rellenos representan el efecto de la toxina salvaje sobre las células 518A2, mientras que las variantes de la cadena A más eficaces se denominaron SAM#3 (cuadrados sin relleno) y SAM#5 (símbolos X).

Siete variantes de la cadena A prometedoras se sometieron nuevamente a escrutinio frente a un panel de líneas celulares (Vero [Mono, riñón normal]; PC-3 [Humano, cáncer de próstata]; HepG2 [Humano, hepatoma]; SiHa [Humano, cáncer cervical]; PanC [Humano, cáncer pancreático]; SKBR-3 [Humano, cáncer de mama]; 518-A2 (Humano, melanoma); U87 [Humano, glioma]; B16-F10 [Ratón, melanoma]; HS-216 [Humano, fibroblasto normal]; CAMA-1 [Humano, cáncer de mama]; OVCAR-3 [Humano, cáncer de ovario]). Entre estas siete, se observó que cuatro tenían actividad frente a una línea de células cancerosas, dos hacia melanoma humano 518-A2, una hacia SiHa (células de cáncer cervical humano) y otra hacia U87-A (células de cáncer cerebral humano; glioma).

Los genes que codificaban las dos toxinas de cadena A (SAM3 y SAM5) que dieron como resultado la toxicidad de las líneas celulares de melanoma humano se secuenciaron para determinar las secuencias de aminoácidos insertadas entre los restos 245 y 246 de la cadena A salvaje. Las secuencias, incluyendo la secuencia etiqueta de histidinas, se relacionan en las Sec. ID Nos. 4 y 5, respectivamente.

TABLA 1

Secuencias de DNA de clones seleccionados al azar de la colección de cadenas A de SLT-1-tripéptidos. Las bases mutadas en negrita. El mutante #41 se identificó en nuestro escrutinio mediante ELISA por presentar una fuerte unión a mAb Onc M27 (Fig. 3)

Variante de la cadena A de SLT-1	Secuencia de nucleótidos	Diversidad (cambios de nucleótidos en la región mutada)
Epitope MUC1	CCA GAC ACG CGA CCA GCT CCA	0/9
Mutante #1	CCA GAC GGG ATC GGG GCT CCA	8/9
Mutante #2	CCA GAC CTG GAG ATG GCT CCA	8/9
Mutante #3	CCA GAC CCC CGT GGG GCT CCA	6/9
Mutante #4	CCA GAC GAC GAC TTG GCT CCA	9/9
Mutante #5	CCA GAC GTC CGG TGG GCT CCA	7/9
Mutante #6	CCA GAC CAG CGC TGG GCT CCA	6/9
Mutante #7	CCA GAC CTC AGG ATG GCT CCA	8/9
Mutante #8	CCA GAC TCC CAG GAG GCT CCA	7/9
Mutante #9	CCA GAC TCC GAC CCC GCT CCA	6/9
Mutante #41	CCA GAC ACG CGC CCC GCT CCA	2/9

TABLA 2

Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de clones seleccionados al azar de la colección de cadenas A de SLT-1-tripéptidos y señal en el ensayo ELISA de las variantes de la cadena A de SLT-1 purificadas detectadas con un mAb (Onc M27) desarrollado frente al epítipo de MUC1 Thr-Arg-Pro. La región tripeptídica mutada en negrita. El mutante #41 se identificó en nuestro escrutinio mediante ELISA por presentar una fuerte unión a mAb Onc M27

Variante de la cadena A de SLT-1	Secuencia de aminoácidos deducida	Lecturas en el ELISA (405 nm)
Epítipo MUC1	CHHHPD TRP APASRVARMASDEFPSMC	1.3
Mutante #1	CHHHPD GIG APASRVARMASDEFPSMC	0.08
Mutante #2	CHHHPD LQM APASRVARMASDEFPSMC	0.03
Mutante #3	CHHHPD PRG APASRVARMASDEFPSMC	0.03
Mutante #4	CHHHPD DDL APASRVARMASDEFPSMC	0.06
Mutante #5	CHHHPD VRW APASRVARMASDEFPSMC	0.07
Mutante #6	CHHHPD QRL APASRVARMASDEFPSMC	0.06
Mutante #7	CHHHPD LRM APASRVARMASDEFPSMC	0.11
Mutante #8	CHHHPD SQE APASRVARMASDEFPSMC	0.13
Mutante #9	CHHHPD SDP APASRVARMASDEFPSMC	0.07
Mutante #41	CHHHPD TRP APASRVARMASDEFPSMC	1.25

REIVINDICACIONES

1. Una colección combinatoria de proteínas que comprende una pluralidad de especies proteicas, comprendiendo cada especie proteica una cadena A de una proteína tóxica AB_x que puede ser escindida por una proteasa en la que se ha introducido un inserto, y en la que
 - (a) el inserto es un polipéptido con una secuencia variable de aminoácidos que tiene una longitud de al menos 2 restos de aminoácido; y
 - (b) el inserto se introduce en un bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A.
2. La colección combinatoria de proteínas de la reivindicación 1, en la que la colección comprende al menos 100 especies proteicas.
3. La colección combinatoria de proteínas de la reivindicación 1 ó 2, en la que las especies proteicas se forman introduciendo el inserto en la cadena A de una toxina I de tipo Shiga.
4. La colección combinatoria de proteínas de la reivindicación 3, en la que la especie proteica se forma introduciendo el inserto entre los aminoácidos 242 y 261, como se define con referencia a la SEC ID N° 1.
5. La colección combinatoria de proteínas de la reivindicación 4, en la que la especie proteica se forma introduciendo el inserto entre los aminoácidos 245 y 246, como se define con referencia a la SEC ID N° 1.
6. La colección combinatoria de proteínas de la reivindicación 3, en la que la especie proteica se forma introduciendo el inserto antes o después de los aminoácidos 1-239 de la cadena A de la toxina I de tipo Shiga, como se define con referencia a la SEC ID N° 1.
7. La colección combinatoria de proteínas de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el inserto tiene una longitud de 7 aminoácidos.
8. Una colección combinatoria de expresión que comprende una pluralidad de especies de sistemas de expresión, expresando cada especie una especie proteica según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Una proteína mutante que comprende una cadena A de una proteína tóxica AB_x en la que se ha introducido un inserto, y en la que
 - (a) el inserto es un polipéptido con una secuencia variable de aminoácidos que tiene una longitud de al menos 2 restos de aminoácido; y
 - (b) el inserto se introduce en un bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A, en el que el inserto tiene afinidad de unión hacia una diana o receptor celular.
10. La proteína mutante de la reivindicación 9, en la que la cadena A de una proteína tóxica es la cadena A de una toxina I de tipo Shiga.
11. La proteína mutante de la reivindicación 10, en la que el inserto se introduce entre los aminoácidos 242 y 261 como se define con referencia a la SEC ID N° 1.
12. La proteína mutante de la reivindicación 11, en la que el inserto se introduce entre los aminoácidos 245 y 246 como se define con referencia a la SEC ID N° 1.
13. La proteína mutante de la reivindicación 12, en la que el inserto comprende la secuencia IYSNKLM (SEC ID N° 6).
14. La proteína mutante de la reivindicación 12, en la que el inserto comprende la secuencia AAFADLI (SEC ID N° 7).
15. La proteína mutante de la reivindicación 10, en la que el inserto se introduce antes o después de los aminoácidos 1-239 de la cadena A de la toxina I de tipo Shiga como se define con referencia a la SEC ID N° 1.
16. La proteína mutante de cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en la que el inserto tiene una longitud de 7 aminoácidos.
17. Un método para identificar un ligando que se une a una diana/receptor, que comprende los pasos de:
 - (a) exponer células que se sabe que poseen una diana/receptor a los miembros de una colección combinatoria de proteínas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y

ES 2 344 844 T3

(b) seleccionar los miembros de la colección de proteínas que se observa que son tóxicos para las células, mediante lo cual se usa una región insertada en un miembro seleccionado que se observa que es tóxico para identificar un posible ligando para una diana/receptor de la superficie celular en la célula.

5 18. Un método para aislar una toxina específica para una diana/receptor conocido que comprende los pasos de:

(a) exponer una diana/receptor conocido a una colección combinatoria de proteínas conocida según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7; y

10 (b) aislar al menos una especie proteica de la colección combinatoria de proteínas capturada por unión a la diana/receptor.

15 19. El método de la reivindicación 18, que comprende además el paso de someter a escrutinio la proteína aislada frente a células que expresan la diana/receptor para confirmar su toxicidad hacia las células que expresan la diana/receptor.

20 20. El método de la reivindicación 18, en el que la diana/receptor es una diana/receptor purificado y se inmoviliza sobre un soporte sólido.

21. El método de la reivindicación 20, en el que la diana/receptor está en la superficie de las células.

22. El método de la reivindicación 21, en el que las células se inmovilizan sobre un soporte sólido.

25 23. El método de la reivindicación 21 ó 22, en el que la toxina sirve como reportero, y la muerte de las células es indicativa de la unión al receptor.

24. La colección combinatoria de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el inserto tiene una longitud de 3 a 200 aminoácidos.

30 25. La colección combinatoria de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que al menos un inserto tiene afinidad de unión por una célula diana o receptora.

35 26. El método de la reivindicación 17, que comprende además el paso de evaluar los miembros seleccionados de la colección de proteínas para determinar la secuencia de la región insertada, mediante lo cual se identifica un péptido con la secuencia de la región insertada como posible ligando para una diana/receptor de la superficie celular en la célula.

40 27. El método de la reivindicación 26, que comprende además el paso de ensayar los péptidos con la secuencia de la región insertada para confirmar que son un ligando para la diana/receptor de la superficie celular.

28. El método de la reivindicación 17, que comprende además el paso de identificar la diana/receptor de la superficie celular que se une al ligando.

45

50

55

60

65

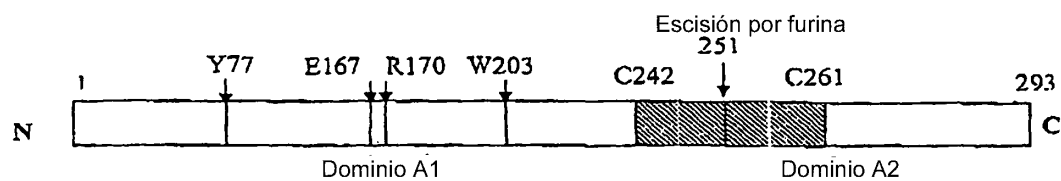


Fig. 1

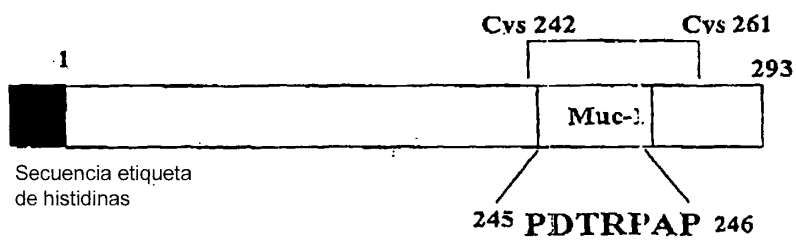


Fig. 2A

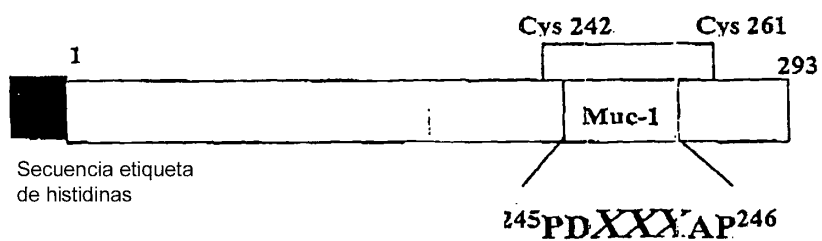


Fig. 2B

Conjunto de datos de ELISA representativo obtenido del escrutinio de 96 variantes de toxina distintas

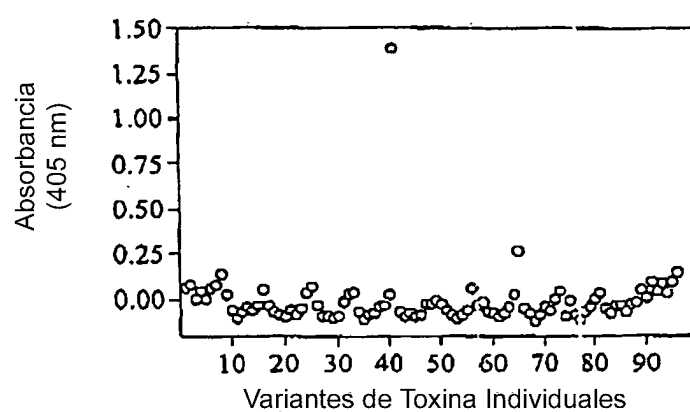


Fig. 3

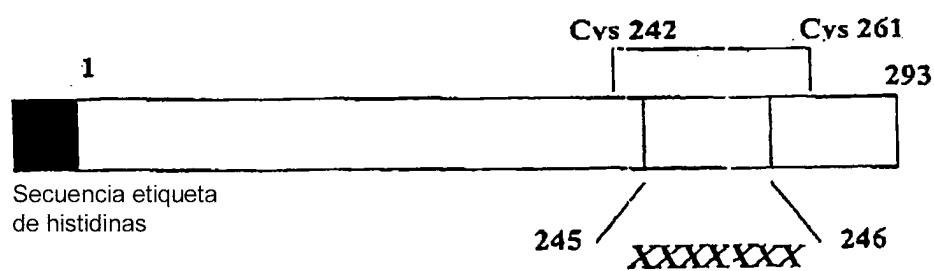


Fig. 4

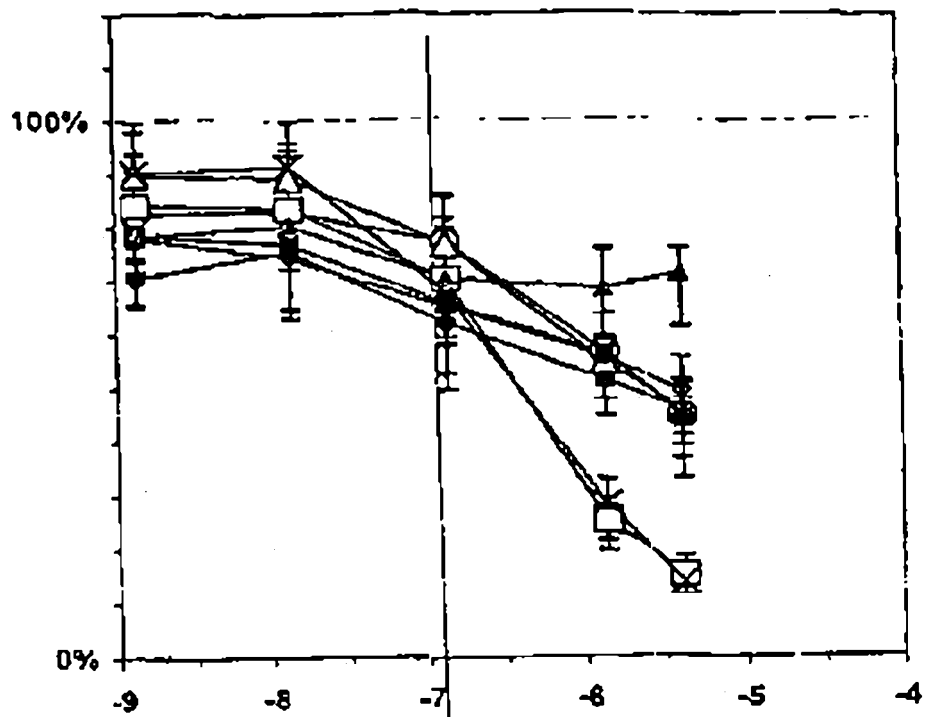


Fig. 5

ES 2 344 844 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Wei, Xin
Qariepy, Jean

<120> COLECCIONES DE MUTANTES DE TOXINAS Y MÉTODOS DE USO

<130> 34104-0082

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 299

<212> PRT

<213> *Escherichia coli*

<220>

<221> característica miscelánea

<223> Cadena A de SLT-1 de tipo salvaje

<400> 1

```

1   Ile Glu Gly Arg Ala Ser Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala
5   1                               10                          15

20  Lys Thr Tyr Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr
35  20                          25                          30

40  Pro Leu Gln Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp
50  35                          40                          45

60  Ser Gly Ser Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp
70  50                          55                          60

80  Pro Glu Glu Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn
90  65                          70                          75                          80

100 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr
110 85                          90                          95

120 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val
130 100                        105                        110

140 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly
150 115                        120                        125

160 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser
170 130                        135                        140

```

ES 2 344 844 T3

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val
 145 150 155 160
 5 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg
 165 170 175
 10 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser
 180 185 190
 15 Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn
 195 200 205
 20 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser
 210 215 220
 25 Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly
 225 230 235 240
 30 Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala
 245 250 255
 35 Arg Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg
 260 265 270
 40 Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu
 275 280 285
 45 Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser
 290 295

<210> 2

<211> 32

40 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

45 <223> Cebador

<400> 2

50 gttactgtga cagctgaagc ttacgttt cg

32

<210> 3

<211> 31

55 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

60 <223> Cebador

<400> 3

65 gagaagaaga gactgcagat tccatctgtt g

31

<210> 4

ES 2 344 844 T3

<211> 302

<212> PRT

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia de la proteína de la colección número 3 de la cadena A de SLT-1 (SAM3)

10 <400> 4

Lys Gly Met Arg Ser His His His His His His His His Ile Glu Gly
1 5 10 15

15

Arg Ala Ser Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr
20 25 30

20

Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln
35 40 45

25

Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu
65 70 75 80

30

Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr
85 90 95

35

Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala
100 105 110

40

Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser
115 120 125

Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg
130 135 140

45

Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp
145 150 155 160

50

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

Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln

55

60

65

ES 2 344 844 T3

	180	185	190
5	Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser 195 200 205		
10	Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg 210 215 220		
15	Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val 225 230 235 240		
20	Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala 245 250 255		
25	Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ile Tyr Ser Asn Lys Leu Met Ala 260 265 270		
30	Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys Pro 275 280 285		
35	Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu 290 295 300		
40	<210> 5 <211> 319 <212> PRT <213> Artificial <220> <223> Secuencia de la proteína de la colección número 5 de la cadena A de SLT-1 (SAM3) <400> 5		
45	Lys Gly Met Arg Ser His His His His His His His His Ile Glu Gly 1 5 10 15		
50	Arg Ala Ser Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr 20 25 30		
55	Val Asp Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln 35 40 45		
60	Thr Ile Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser 50 55 60		
65	Gly Asp Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu 65 70 75 80		

ES 2 344 844 T3

Gly Arg Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr
 85 90 95
 5 Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala
 100 105 110
 10 Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser
 115 120 125
 Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg
 130 135 140
 15 Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp
 145 150 155 160
 20 Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala
 165 170 175
 Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln
 180 185 190
 25 Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser
 195 200 205
 30 Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg
 210 215 220
 Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val
 225 230 235 240
 35 Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala
 245 250 255
 40 Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ala Phe Ala Asp Leu Ile Ala
 260 265 270
 Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys Pro
 275 280 285
 Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu Trp Asp
 290 295 300
 50 Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser Ser
 305 310 315
 55 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Primer inserto activo de melanoma
 65

ES 2 344 844 T3

<400> 6

Ile Tyr Ser Asn Lys Leu Met
1 5

5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

15

<223> Segundo inserto activo de melanoma

<400> 7

Ala Ala Phe Ala Asp Leu Ile
1 5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65