

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 919 749**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)

**C07K 14/245** (2006.01)

**C07K 14/25** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2015 E 18207811 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.09.2021 EP 3514168**

54 Título: **Moléculas dirigidas a células citotóxicas resistentes a la escisión por proteasa**

30 Prioridad:

**11.06.2014 US 201462010918 P**  
**26.01.2015 WO PCT/US2015/012970**

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

**28.07.2022**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

**ES 2 919 749 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

Moléculas dirigidas a células citotóxicas resistentes a la escisión por proteasa

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a moléculas dirigidas a células citotóxicas que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga derivados de subunidades A de toxinas Shiga de origen natural, en las que hay un sitio de escisión por furina alterado cerca del extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga, y un resto molecular asociado en carboxi terminal a la región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga; tal como se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga descritos en este documento son beneficiosos como componentes de moléculas dirigidas a células, por ejemplo, agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Por ejemplo, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga descritos en este documento pueden usarse como componentes de moléculas dirigidas a células citotóxicas, por ejemplo, inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina, para su uso en la eliminación selectiva de tipos de células específicas. Las moléculas de la presente invención pueden tener una toxicidad no específica reducida después de la administración a un organismo, pero sin ningún efecto aparente sobre la citotoxicidad dirigida específicamente. Además, las moléculas de la presente invención pueden tener una estabilidad mejorada durante la producción, el almacenamiento y la administración. Las moléculas de la presente invención comprenden regiones de unión para mediar en los polipéptidos efectores de la toxina Shiga dirigidos a células y catalíticamente activos para efectuar la citotoxicidad, tal como se define en las reivindicaciones. Las moléculas de la presente invención tienen usos, por ejemplo, como componentes de agentes terapéuticos y de diagnóstico para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluyendo cánceres, tumores, trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas.

## 25 ANTECEDENTES

Las toxinas Shiga han sido diseñadas para su uso en aplicaciones terapéuticas mediante alteraciones racionales en la estructura, las características y las actividades biológicas de la toxina (véanse, por ejemplo las patentes US7713915, EP1051482, EP1727827, EP1945660; y solicitudes de patentes: US2009/0156417 A1, EP2228383 B1, EP2402367 A1, US2013/0196928 A1, WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/120058, WO 2015/138435 y WO 2015/138452. Las toxinas Shiga y los componentes de la misma pueden usarse para diseñar moléculas terapéuticas, tales como, por ejemplo, inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina que explotan la combinación de la alta citotoxicidad de las toxinas Shiga con la unión a la diana con alta afinidad para el reconocimiento preciso *in vivo*. En particular, las subunidades A catalíticas de las toxinas Shiga son estables, enzimáticamente activas y citotóxicas incluso si están truncadas o fusionadas con otros dominios de la proteína (Haddad J et al, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993); Backer M et al, J Control Release 74: 349-55 (2001); Backer M, Backer J, Bioconjug Chem 12: 1 066-73 (2001); LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Di R et al, Toxicon 57: 525-39 (2011)). En el diseño de moléculas sintéticas que comprenden los polipéptidos de la subunidad A de la toxina Shiga, el mecanismo natural de la intoxicación por la toxina Shiga puede ser una consideración importante.

Numerosas toxinas bacterianas dependen de procesamiento específico de sitio por la célula huésped, las proteasas intracelulares para la citotoxicidad óptima, tales como, por ejemplo, para la activación de la toxina y/o ruta subcelular (véase, por ejemplo Thomas G, Nat Rev Mol Cell Biol 3: 753-66 (2002)). Las toxinas Shiga emplean escisión específica de sitio para la activación de la toxina y el direccionamiento subcelular. La actividad de la toxina Shiga se incrementa por escisión proteolítica (Brown J et al, FEBS Lett 117: 84-8 (1980); Reisbig R et al, J Biol Chem 256: 8739-44 (1981)). Las toxinas Shiga requieren la escisión intracelular de sus subunidades A por la endoproteasa furina en las células intoxicadas para la eliminación más eficiente de células intoxicadas (Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, J Biol Chem 270: 10817-21 (1995); Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)). Este procesamiento proteolítico debe tenerse en cuenta en el diseño de moléculas que comprenden componentes derivados de la subunidad A de la toxina Shiga para suministrar la activación de la toxina más eficiente y/o el direccionamiento subcelular requerida para una citotoxicidad máxima de la toxina Shiga (ver Garred Ø et al., Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

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 estructuralmente y funcionalmente relacionadas (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparten la misma estructura general y el mecanismo de acción (Engedal, N et al, Microbial Biotech. 4: 32-46 (2011)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga son empleados por bacterias como factores de virulencia durante la infección de un huésped (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). En huéspedes infectados, las toxinas Shiga son citotóxicas debido a las potentes capacidades de las toxinas para inhibir la síntesis de proteínas y para desencadenar la muerte celular apoptótica (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Los potentes efectos citotóxicos de toxinas Shiga en las células huésped pueden dar lugar a colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en los seres humanos (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)).

Los miembros de la familia de toxina Shiga comparten una estructura proteica multimérica común caracterizada por una disposición A(B)<sub>5</sub> de subunidades de proteína de Shiga (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Cada toxina Shiga se compone de dos subunidades de proteína, A y B, que se asocian en una disposición A(B)<sub>5</sub> para formar un complejo de proteínas de holotoxina. La subunidad A de la toxina Shiga es un monómero de aproximadamente 32-33 kilodaltons (kDa) que contiene un dominio enzimático y la subunidad B de la toxina Shiga es una subunidad de aproximadamente 7,6 a 7,7 kDa que se asocia con otras cuatro subunidades B de la toxina Shiga para formar un pentámero de aproximadamente 38,1-38,5 kDa de subunidades B de la toxina Shiga. El pentámero de subunidades B se asocia con una subunidad A para formar la holotoxina Shiga, que es de aproximadamente 70-72 kDa (O'Brien A, Holmes, R, Microbiol Rev 51: 206-20 (1987)). En general, la subunidad A de la toxina Shiga forma una única proteína globular con una hélice que se extiende en el pentámero de subunidades B dentro de la holotoxina (Fraser M et al, Acta Crystallogr Sect. F Struct Biol Cryst Commun. 62: 627-30 (2006)).

La muerte celular eficiente por las toxinas Shiga requiere la escisión intracelular de la subunidad A de la toxina Shiga en una estructura en bucle extendido, expuesta a la superficie, conservada, la estructura por la endoproteasa furina (Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, J Biol Chem 270: 10817-21 (1995); Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)). El fragmento amino terminal de la subunidad A de la toxina Shiga escindida por furina se llama el "fragmento A1" de la toxina Shiga (o Stxn-A1, SLTn-A1, SLT-NA1), y el fragmento carboxi terminal de la subunidad A se llama "fragmento A2" de la toxina Shiga. El fragmento A1 de la toxina Shiga es un polipéptido de aproximadamente 27,5 kDa que contiene el dominio catalítico de la toxina Shiga (Fraser M et al, Nat Struct Biol. 1: 59-64 (1994)).

Sólo el fragmento A1 de la toxina Shiga se localiza en el citosol de las células intoxicadas, ya que el fragmento A2 y subunidades B de la toxina Shiga permanecen en el retículo endoplásmico (Tam P, Lingwood C, Microbiology 153: 2700-10 (2007)). La escisión proteolítica de las subunidades A de la toxina Shiga en esta estructura de bucle extendida conservada contribuye a la liberación del fragmento A1 catalítico y el direccionamiento subcelular del fragmento A1 al citosol (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). El fragmento A2 de la toxina Shiga es un polipéptido de aproximadamente 4,5 a 4,7 kDa que es superfluo para la actividad catalítica (Haddad J et al, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993); Backer M et al, J Control Release 74: 349- 55 (2001); Backer M, Backer J, Bioconjug Chem 12: 1066-1073 (2001); LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Di R et al, Toxicon 57: 525 -39 (2011)).

La furina es una endoproteasa de serina especializada que se expresa por una amplia variedad de tipos de células, en todos los tejidos humanos examinados, y por la mayoría de las células animales (ver Shiryayev S et al, J Biol Chem 282: 20847-53 (2007)). La furina escinde polipéptidos que comprenden motivos accesibles a menudo centrados en el motivo de consenso mínimo dibásico R-x-(R/K/x)-R (Thomas G, Nat Rev Mol Cell Biol 3: 735-66 (2002); Tian S, Biochem Insights 2: 9-20 (2009)). Las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga comprenden una estructura de bucle extendido, expuesta a la superficie, conservada (por ejemplo, 242-261 en stxA y SLT-1A y 241-260 en SLT-2) con un motivo S-R/Y-x-x-R conservado que se escinde por furina (Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, J Biol Chem. 270: 10817-21 (1995); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res. Commun 357: 144-9 (2007); Faqerquist C, Sultan O, J Biomed Biotechnol 2010: 123460 (2010)). La estructura de bucle extendido expuesta a la superficie situada en los residuos de aminoácidos 242 a 261 en stxA se requiere para la escisión inducida por furina de stxA, incluyendo las características que flanquean el motivo mínimo de escisión por furina R-x-x-R (Kurmanova A et al., Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

Durante la intoxicación por la toxina Shiga, la subunidad A es proteolíticamente escindida por furina en el enlace carboxi de un residuo de arginina conservado (por ejemplo, el residuo de arginina en la posición 251 en stxA y SLT-1A y el residuo arginina en la posición 250 en Stx2A y SLT-2A) (Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, J Biol Chem. 270: 10817-21 (1995); Faqerquist C, Sultan O, J Biomed Biotechnol 2010: 123460 (2010)). La escisión por furina de las subunidades A de la toxina Shiga se produce en compartimentos endosomales y/o compartimentos de Golgi (Garred Ø et al, J Biol Chem 270: 10817-21 (1995); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

Se requiere la disociación del fragmento A1 de la toxina Shiga del fragmento A2 para la activación del dominio catalítico del fragmento A1 (Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, J. Biol Chem 270: 10817-21 (1995); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)). Los dominios catalíticos de toxinas Shiga están inactivos antes de la escisión por furina posiblemente porque la parte A2 de la subunidad A ocluye la hendidura del sitio activo de la parte A1, con metionina-260 de la parte A2 que sobresale y bloquea el sitio activo de la parte A1 (Lea N et al, Microbiology 145: 999-1.004 (1999); véase también Fraser M et al, Nat Struct Biol. 1: 59-64 (1994)).

Se requiere la disociación del fragmento de la toxina A1 de Shiga del fragmento A2 y el resto de la holotoxina Shiga para la translocación del fragmento A1 desde el lumen del retículo endoplásmico al citosol (LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Li S et al, PLoS One. 7: e41119 (2012)). La liberación del fragmento A1 expone un dominio hidrófobo que desencadena una serie de etapas complejas: 1) el reconocimiento del fragmento A1 por el sistema de degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD), 2) desplegamiento, 3) retrotranslocación a través

de la membrana del retículo endoplásmico y 4) el replegamiento a una formación catalítica en el citosol (Li S et al, PLoS One. 7: e41119 (2012)).

5 En primer lugar, el extremo carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga, que se expone después de la escisión por furina y la liberación del resto de la holotoxina Shiga, es reconocido por el sistema ERAD. El sistema ERAD identifica proteínas mal plegadas en el extremo terminal en el RE, las marca con poliubiquitina y las exporta al citosol para la destrucción proteasomal (Smith M et al, Science 334: 1086-1090 (2011)). Los fragmentos A1 de toxinas Shiga explotan la vía ERAD para obtener acceso al citosol tal vez mediante la imitación de un sustrato de ERAD desplegada a través de una región de polipéptido localmente mal plegado, que comprende un parche zona de restos de aminoácidos relativamente hidrófobos, situado en los extremos carboxi terminales de los fragmentos A1 creados por la escisión por furina (LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Yu M, Haslam D, Infect Immun., 73: 2524-32 (2005); Li S et al, PLoS One. 7: e41119 (2012)). El parche parcialmente desplegado, hidrófobo, de residuos de aminoácidos cerca del extremo carboxi terminal de los fragmentos A1 de la toxina Shiga expuesto por la escisión por furina puede ser reconocido por las proteínas de chaperona del retículo endoplásmico del sistema ERAD (LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Yu M, Haslam D, Infect Immun 73: 2524-32 (2005); Li S et al, PLoS One. 7: e41119 (2012)).

20 Cuando un fragmento A1 de la toxina Shiga entra primero en el citosol de una célula eucariota intoxicada, se cree que se poliubiquitina y en una conformación sustancialmente desordenada como consecuencia de estar desplegado, por tanto, los fragmentos A1 deben evitar la degradación proteasomal y replegarse en una conformación catalíticamente activa a fin de ejercer su actividad citotóxica catalítica (Tam P, Lingwood C, Microbiology 153: 2700-10 (2007); Li S et al, PLoS One 7: e41119 (2012)). Una vez en el citosol, un fragmento A1 activo de la toxina Shiga puede paralizar irreversiblemente un ribosoma eucariótica tras otro a través de la actividad enzimática potente del fragmento A1 a una velocidad de aproximadamente 700 ribosomas por minuto (Brigotti M et al, Toxicon 35: 1431-1437 (1997); Tam P, Lingwood C, Microbiology 153: 2700-10 (2007)). Después de inactivar un número umbral de ribosomas, se predice que una célula huésped intoxicada 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)).

30 La escisión por furina intracelular de la subunidad A de la toxina Shiga entre los fragmentos A1 y A2 es importante para la máxima citotoxicidad de la toxina Shiga. Los experimentos que muestran una máxima citotoxicidad de holotoxina de Shiga requiere 1) el sitio mínimo de escisión por furina R/Y-x-x-R situado entre los fragmentos A1 y A2 en la subunidad A de la toxina Shiga; 2) ciertos residuos de aminoácidos en la estructura de bucle extendido expuesta a la superficie en la subunidad A de la toxina Shiga que comprende el sitio mínimo de escisión por furina; y 3) la expresión celular de furina por las células de vertebrados intoxicados.

40 Las células humanas que carecen de furina están protegidas contra la citotoxicidad de la toxina Shiga y estas mismas células deficientes de furina se pueden hacer sensibles a la toxina Shiga por la expresión forzada de furina (Garred Ø et al, J Biol Chem. 270: 10817-21 (1995); Kurmanova. A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

45 Se demostró que la furina era necesaria para la máxima citotoxicidad de la toxina Shiga en ciertas células de cáncer humano (Garred Ø et al, J Biol Chem 270: 10817-21 (1995); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)). Las toxinas Shiga con sitios y/o mutaciones alterados de la escisión por furina en estructuras de bucles extendidos expuestas a la superficie conservadas muestran una reducción de la citotoxicidad. La alteración del motivo de escisión por furina S-R/Y-x-x-R en el bucle extendido expuesto a la superficie de subunidades A de la toxina Shiga con sustituciones o deleciones de residuos de aminoácidos dio lugar a la escisión menos eficiente de las subunidades A y la inhibición de ribosomas menos eficiente en células de vertebrados (Burgess B, Roberts L, Mol Microbiol 10: 171-9 (1993); Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999); Kurmanova A et al., Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)). La alteración del motivo de escisión por furina en la subunidad A de SLT-1 redujo su actividad de inhibición de ribosomas en 60 veces (Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999)). Además, la alteración de las regiones flanqueantes del motivo de escisión por furina sin alterar el motivo mínimo de escisión por furina R-x-x-R también redujo la actividad de inhibición de ribosomas de Stx (Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

60 La citotoxicidad de la toxina Shiga se puede aumentar para mutantes de toxina Shiga resistentes a la escisión por furina y para células deficientes de furina mediante el pretratamiento de holotoxinas de Shiga con furina *in vitro* antes de intoxicar células. Las subunidades A de la toxina Shiga se pueden escindir eficientemente *in vitro* por furina (Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995)). El pretratamiento de Stx con furina *in vitro* antes de la administración a células humanas deficientes de furina dio lugar a un aumento de la actividad de inhibición de ribosomas en 30-50 veces (Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Kurmanova A et al., Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)). Del mismo modo, el pretratamiento de una toxina Shiga mutante resistente a la escisión por furina con tripsina *in vitro* dio lugar a un aumento de la inhibición de ribosomas en células de vertebrados intoxicadas en comparación con células intoxicadas con toxinas de Shiga no tratadas resistentes a la escisión por furina (Kurmanova A et al., Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

La disociación del fragmento A1 del fragmento A2 puede ser necesaria para la activación del dominio catalítico del fragmento A1 (Garred Ø et al, *Exp Cell Res* 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, *J Biol Chem* 270: 10817-21 (1995); Kurmanova A et al, *Biochem Biophys Res Commun* 357: 144-9 (2007)). Los dominios catalíticos de toxinas Shiga podrían ser inactivas antes de la escisión por furina porque el dominio catalítico está estéricamente bloqueado (Lea N et al, *Microbiología* 145: 999-1004 (1999); véase también Fraser M et al, *Nat Struct Biol* 1: 59 -64 (1994)).

El modelo de citotoxicidad de toxina Shiga es que el procesamiento proteolítico intracelular de las subunidades A de toxina Shiga por furina en las células intoxicadas es esencial para 1) la liberación del fragmento A1 del resto de la holotoxina Shiga, 2) escape del fragmento A1 del retículo endoplásmico mediante la exposición de un dominio hidrófobo en el extremo carboxi terminal del fragmento A1, y 3) la activación enzimática del fragmento A1 (ver Johannes L, Römer W, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010)). La liberación eficiente del fragmento A1 de la toxina Shiga del fragmento A2 y el resto de los componentes de la holotoxina Shiga en el retículo endoplásmico de las células intoxicadas es esencial para un direccionamiento eficiente intracelular al citosol, la actividad enzimática máxima, la inactivación eficiente de ribosoma y el logro de una citotoxicidad óptima, es decir, comparable con una toxina Shiga de tipo salvaje.

La liberación del fragmento A1 de la toxina Shiga de todos los otros restos puede ser necesaria tanto para 1) exponer el extremo carboxi terminal del fragmento A1 para el reconocimiento por factores celulares dentro del retículo endoplásmico de células intoxicadas y 2) maximizar la actividad catalítica.

Se requiere que la liberación del fragmento A1 de la toxina Shiga se exponga al extremo carboxi terminal del fragmento A1. La región hidrófoba alrededor de 224 a 241 en la región carboxi terminal del fragmento A1 de stxA se cree que juega un papel en la retrotranslocación del fragmento A1 desde el lumen del retículo endoplásmico al citosol (Suhan M, Hovde C, *Infect Immun* 66: 5252-9 (1998); LaPointe P et al, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). Varios residuos aminoácidos en esta región hidrófoba se vuelven más accesibles a la superficie después de la escisión de las subunidades A de la toxina Shiga tanto en Stx1A como en Stx2A (Di R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). Por lo tanto, la liberación del fragmento A1 de la toxina Shiga y la exposición de su región hidrófoba carboxi terminal pueden desencadenar el transporte del fragmento A1 desde el retículo endoplásmico al citosol (Suhan M, Hovde C, *Infect Immun* 66: 5252-9 (1998); LaPointe P et al, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005); Di R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). Además, el extremo carboxi terminal del fragmento A1 puede funcionar como un ligando reconocido y unido por un receptor reticular endoplásmico, distinto de una proteína chaperona, que contribuye a la retrotranslocación eficiente del fragmento A1 (LaPointe P et al., *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)).

Los cambios estructurales que potencian la citotoxicidad del fragmento A1 de la toxina Shiga podrían tener lugar después de la liberación del fragmento A1 de todos los otros restos. El fragmento A1 libre de la toxina Shiga podría mostrar una actividad catalítica óptima, tal como, por ejemplo, mediante la exposición de algunas regiones catalíticas enterradas en la estructura de holotoxina Shiga (ver Tesh V et al, *Infect Immun*. 61: 3392-402 (1993); Di R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). La activación catalítica de la toxina Shiga después de la escisión proteolítica y la exposición a condiciones de reducción o mejora de la toxicidad de la toxina Shiga después de procesamiento proteolítico y la exposición a condiciones de reducción son muy probablemente el resultado de la separación del fragmento A1 del fragmento A2 (Tesh V et al., *Infect Immun* 61: 3392-402 (1993)). Los cambios estructurales al fragmento A1 de toxina Shiga después de la disociación del resto de la holotoxina Shiga pueden estar relacionados con cambios funcionales, tales como, por ejemplo, la capacidad de formar una estructura recién plegada que es más catalíticamente activa después de desplegarse por la maquinaria ERAD y translocarse al citosol, la capacidad del fragmento A1 citosólico de evadir la degradación por el proteasoma, y la capacidad de formar estructuras con más sitios catalíticos activos abiertos y/o hendiduras de unión que aumentan la actividad enzimática (Di R et al, *Toxicon* 57: 525- 39 (2011)).

Por ejemplo, los residuos catalíticos N75 y Y77 en Stx1A pueden disponerse más expuestos al disolvente después de la liberación del fragmento A1 de la toxina Shiga y muchos de los residuos en el extremo carboxi terminal del fragmento A1 de ambos Stx1 y Stx2 de alrededor de las posiciones de residuos de aminoácidos 205 a 250 pueden sufrir cambios significativos en la accesibilidad de la superficie después de la liberación del fragmento A1 (Di R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). En particular, los residuos de aminoácidos en las regiones 240-251 de Stx1A y 239-250 de Stx2A mostraron un aumento espectacular en la exposición de la superficie después de la liberación de fragmentos A1 de la toxina Shiga (Di R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011) ). Otro ejemplo es que los residuos de aminoácidos en las regiones 42-49 y 246-250 de Stx2A pueden disponerse más expuestos al disolvente después de la liberación de fragmentos A1 de la toxina Shiga (Smith M et al, *Infect Immun* 77: 2730-40 (2009); Di. R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). Por lo tanto, la liberación del fragmento A1 de la toxina Shiga de todos los otros restos puede ser necesaria para una máxima citotoxicidad de la toxina Shiga debido a los cambios estructurales y funcionales que mejoran el direccionamiento subcelular del fragmento A1 al citosol de las células intoxicadas, la actividad enzimática del fragmento A1 en el citosol de las células intoxicadas y persistencia del fragmento A1 en el citosol de las células intoxicadas.

En resumen, se cree que la citotoxicidad máxima de la toxina Shiga requiere la escisión de subunidad A de la toxina Shiga, la exposición en el retículo endoplasmático de una región hidrófoba proximal al extremo carboxi terminal del

fragmento A1, y la liberación del fragmento A1 del resto de la holotoxina, todo ello podría dar lugar a múltiples cambios estructurales y funcionales al fragmento A1. Además, se cree que el transporte intracelular óptimo de los fragmentos A1 de la toxina Shiga al citosol requiere los mismos eventos: escisión de subunidades A, exposición del extremo carboxilo terminal del fragmento A1, y la liberación del fragmento A1 de todas las otras fracciones moleculares. En ausencia de la escisión por furina de la subunidad A de la toxina Shiga, el direccionamiento subcelular de los dominios catalíticos de la toxina Shiga puede tener lugar, pero no es el óptimo, es menos eficiente, y da lugar a reducciones en la eficacia de la inhibición de la inhibición de ribosomas (Garred Ø et al., Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

Dado que el procesamiento proteolítico por furina de subunidades A de toxina Shiga en células de vertebrados intoxicados es crítico para la citotoxicidad máxima, es importante en el diseño de moléculas citotóxicas derivadas de subunidades A de la toxina Shiga mantener o compensar este procesamiento proteolítico de origen natural con el fin de conservar la máxima citotoxicidad de la toxina Shiga. No había ninguna solución conocida que compensara completamente la falta de escisión por furina de estructuras que comprenden una subunidad A de toxina Shiga resistente a la escisión por furina ligada a un resto carboxi terminal que perturba el direccionamiento subcelular natural y/o la citotoxicidad del componente derivado del fragmento A1 de la toxina Shiga.

WO 2013/080147 describe una proteína de fusión anticáncer. Sería deseable disponer de moléculas citotóxicas que comprendan componentes derivados de la subunidad A de la toxina Shiga que sean tan citotóxicos como sea posible. También sería deseable tener moléculas dirigidas a células mejoradas que comprenden componentes polipeptídicos efectores de la toxina Shiga que mantienen una alta potencia para eliminar tipos específicos de células en diversas aplicaciones médicas. Sin embargo, sigue habiendo una necesidad en la técnica de formas para diseñar moléculas citotóxicas que comprenden regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga con tóxicos no específicas reducidas, estabildades mejoradas, vidas medias *in vivo* aumentadas y/o perfiles de toxicidad mejorados después de la administración a los organismos cuando las moléculas citotóxicas comprenden restos moleculares carboxi terminales, tales como, por ejemplo, de direccionamiento celular, regiones de unión de tipo inmunoglobulina.

### 30 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona varias moléculas citotóxicas dirigidas a células que comprenden polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa, tal como se define en las reivindicaciones, que pueden ser utilizadas como componentes de varias composiciones de la materia, tales como composiciones de diagnóstico. La presente invención proporciona varias moléculas dirigidas a células que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa funcionalmente asociados con regiones de unión para efectuar el reconocimiento de células, tal como se define en las reivindicaciones. La asociación de regiones de unión dirigidas a células con polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa permite el diseño del direccionamiento específico del tipo de célula de la potente citotoxicidad y/o citostasis de la toxina Shiga mejorando al mismo tiempo la tolerabilidad *in vivo*. Ciertas moléculas dirigidas a células de la presente invención tienen una utilidad mejorada para la administración a vertebrados, ya sea como un agente terapéutico y/o agente de diagnóstico debido a la reducción de la probabilidad de producir efectos tóxicos no específicos a una dosis dada.

En ciertas realizaciones definidas en las reivindicaciones, la molécula dirigida a células de la presente invención comprende 1) una región de unión que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende uno o más polipéptidos y es capaz de unirse específicamente al menos a una biomolécula diana extracelular, y 2) un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión está asociada con el extremo carboxilo terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión está fusionada con el polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión está fusionada con el polipéptido efector de la toxina Shiga para formar un único polipéptido continuo. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión está fusionada con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, ya sea directa o indirectamente. En ciertas realizaciones, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga está unido a la región de unión por al menos un enlace covalente que no es un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se selecciona 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<sub>H</sub>H), dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un pez cartilaginoso, nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento V<sub>NAR</sub>, 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, fragmento de unión a antígeno (Fab), 10<sup>o</sup> dominio de tipo III de fibronectina derivado de fibronectina (10Fn3), dominio de tipo III

de tenascina, dominio del motivo de repetición de anquirina, dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR-A), lipocalina (anticalinas), dominio Kunitz, dominio Z derivado de Proteína A, dominio derivado de cristalina gamma B, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d (afitinas), 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. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión es capaz de unirse a la biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAMs (por ejemplo, EGP-2, EGP-40), EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, endoglina, proteína activada por fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, CD133, CEA, gpA33, mucina, TAG-72, 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, RANKL, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa humana 1 (TYRP1), proteína humana relacionada con tirosinasa 2, 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 humano, 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, CD52, CD133, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεR1a, galectina-9, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, FcεR1a, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, cD11a-c, GITRL, 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. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención a una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión, la molécula dirigida a células es capaz de causar la muerte de la célula. Para ciertas realizaciones adicionales, tras la administración de la molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células en una CD<sub>50</sub> que es al menos tres veces menor que el CD<sub>50</sub> observado para los tipos de células que no se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula dirigida a células. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células 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, tras la administración de la molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células, 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 de al menos 3 veces mayor. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células en una superficie celular, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a células 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 adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 4-49. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 50-61. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende además un motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL ('KDEL' descrito como SEQ ID NO: 62). En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende el motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal seleccionado del grupo que consiste en: KDEL (SEQ ID NO: 62), HDEF (SEQ ID NO: 63), HDEL (SEQ ID NO: 64), RDEF (SEQ ID NO: 65), RDEL (SEQ ID NO: 66), WDEL (SEQ ID NO: 67), YDEL (SEQ ID NO: 68), HEEF (SEQ ID NO: 69), HEEL (SEQ ID NO: 70), KEEL (SEQ ID NO: 71), REEL (SEQ ID NO: 72), KAEL (SEQ ID NO: 73), KCEL (SEQ ID NO: 74), KFEL (SEQ ID NO: 75), KGEL (SEQ ID NO: 76), KHEL (SEQ ID NO: 77), KLEL (SEQ ID NO: 78), KNEL (SEQ ID NO: 79), KQEL (SEQ ID NO: 80), KREL (SEQ ID NO: 81), KSEL (SEQ ID NO: 82), KVLEL (SEQ ID NO: 83), KWEL (SEQ ID NO: 84), KYEL (SEQ ID NO: 85), KEDL (SEQ ID NO: 86), KIEL (SEQ ID NO: 87), DKEL (SEQ ID NO: 88), FDEL (SEQ ID NO: 89), KDEF (SEQ ID NO: 90), KKEL (SEQ ID NO: 91), HADL (SEQ ID NO: 92), HAEL (SEQ ID NO: 93), HIEL (SEQ ID NO: 94), HNEL (SEQ ID NO: 95), HTEL (SEQ ID NO: 96), KTEL (SEQ ID NO: 97), HVEL (SEQ ID NO: 98), NDEL (SEQ ID NO: 99), QDEL (SEQ ID NO: 100), REDL (SEQ ID NO: 101), RNEL (SEQ ID NO: 102), RTDL (SEQ ID NO: 103), RTEL (SEQ ID NO: 104), SDEL (SEQ ID NO: 105), TDEL (SEQ ID NO: 106) y SKEL (SEQ ID NO: 107). En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a

células de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación con relación a una subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga que reduce o elimina la actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga pero no reduce el direccionamiento subcelular al citosol, de al menos una parte del polipéptido efector de la toxina Shiga, por debajo del nivel de direccionamiento subcelular de un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo natural.

En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células de la presente invención comprende 1) un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1, que comprende una o más mutaciones en el motivo mínimo de escisión por furina con respecto a una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje; y 2) una región de unión capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular y asociada con el extremo carboxilo terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En estas realizaciones de las moléculas dirigidas a células de la invención, una mutación en el motivo mínimo de escisión por furina es una delección, inserción y/o sustitución de al menos un residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina R/Y-x-x-R. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga está unido a la región de unión por al menos un enlace covalente que no es un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión está fusionada con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, ya sea directa o indirectamente. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión está fusionada con el extremo carboxilo terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga para formar un único polipéptido continuo. En ciertas realizaciones, la región de unión cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se selecciona 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<sub>H</sub>H), dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un pez cartilaginoso, nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento V<sub>NAR</sub>, 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, fragmento de unión a antígeno (Fab), 10° dominio de tipo III de fibronectina derivado de fibronectina (10Fn3), dominio de tipo III de tenascina, dominio del motivo de repetición de anquirina, dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR-A), lipocalina (anticalinas), dominio Kunitz, dominio Z derivado de Proteína A, dominio derivado de cristalina gamma B, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d (afitinas), 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. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, la región de unión es capaz de unirse a la biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAMs (por ejemplo, EGP-2, EGP-40), EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, endoglina, proteína activada por fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, CD133, CEA, gpA33, mucina, TAG-72, 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, RANKL, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa humana 1 (TYRP1), proteína humana relacionada con tirosinasa 2, 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 humano, 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, CD52, CD133, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FceRIa, galectina-9, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, FceRIa, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, cD11a-c, GITRL, 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. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención a una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión, la molécula dirigida a células es capaz de causar la muerte de la célula. Para ciertas realizaciones adicionales, tras la administración de la molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células en una CD<sub>50</sub> que es al menos tres veces menor que el CD<sub>50</sub> observado para los tipos de células que no se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula dirigida a células. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células 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, tras la administración de la molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células, 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 de al menos 3 veces mayor. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células en una superficie celular, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a células 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 adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 4-36. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 50-61. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende además un motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL ('KDEL' descrito como SEQ ID NO: 62). En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende el motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal seleccionado del grupo que consiste en: KDEL (SEQ ID NO: 62), HDEF (SEQ ID NO: 63), HDEL (SEQ ID NO: 64), RDEF (SEQ ID NO: 65), RDEL (SEQ ID NO: 66), WDEL (SEQ ID NO: 67), YDEL (SEQ ID NO: 68), HEEF (SEQ ID NO: 69), HEEL (SEQ ID NO: 70), KEEL (SEQ ID NO: 71), REEL (SEQ ID NO: 72), KAEL (SEQ ID NO: 73), KCEL (SEQ ID NO: 74), KFEL (SEQ ID NO: 75), KGEL (SEQ ID NO: 76), KHEL (SEQ ID NO: 77), KLEL (SEQ ID NO: 78), KNEL (SEQ ID NO: 79), KQEL (SEQ ID NO: 80), KREL (SEQ ID NO: 81), KSEL (SEQ ID NO: 82), KVEL (SEQ ID NO: 83), KWEL (SEQ ID NO: 84), KYEL (SEQ ID NO: 85), KEDL (SEQ ID NO: 86), KIEL (SEQ ID NO: 87), DKEL (SEQ ID NO: 88), FDEL (SEQ ID NO: 89), KDEF (SEQ ID NO: 90), KKEL (SEQ ID NO: 91), HADL (SEQ ID NO: 92), HAEL (SEQ ID NO: 93), HIEL (SEQ ID NO: 94), HNEL (SEQ ID NO: 95), HTEL (SEQ ID NO: 96), KTEL (SEQ ID NO: 97), HVEL (SEQ ID NO: 98), NDEL (SEQ ID NO: 99), QDEL (SEQ ID NO: 100), REDL (SEQ ID NO: 101), RNEL (SEQ ID NO: 102), RTDL (SEQ ID NO: 103), RTEL (SEQ ID NO: 104), SDEL (SEQ ID NO: 105), TDEL (SEQ ID NO: 106) y SKEL (SEQ ID NO: 107). En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación con relación a una subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga que reduce o elimina la actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga pero no reduce el direccionamiento subcelular al citosol, de al menos una parte del polipéptido efector de la toxina Shiga, por debajo del nivel de direccionamiento subcelular de un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo natural.

En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células citotóxica de la presente invención comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende 1) una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal tal como se define en las reivindicaciones, y 2) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 tal como se define en las reivindicaciones; y comprende además una región de unión capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular y un resto molecular, tal como se define en las reivindicaciones, asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga; y la molécula dirigida a células citotóxica es capaz de mostrar una citotoxicidad equivalente a la citotoxicidad de una segunda molécula dirigida a células que consiste en la molécula dirigida a células, excepto por el polipéptido efector de la toxina Shiga que consiste en un polipéptido A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje. Esto significa que la segunda molécula dirigida a células comprende la misma región de unión y el mismo resto molecular que la molécula dirigida a células de la invención, pero en lugar de comprender el mismo polipéptido efector de la toxina Shiga, la segunda molécula dirigida a células comprende un polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje que comprende una región del fragmento A1 de la toxina Shiga (por ejemplo, los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o aminoácidos 1-250 de la SEQ ID NO: 3) que tiene un extremo carboxi terminal y un sitio de escisión por furina de tipo salvaje en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 del polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje; en el que el resto molecular está asociado con el extremo carboxi terminal de la polipéptido A1 de toxina Shiga de tipo salvaje con la misma asociación que en la primera molécula dirigida a células. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende al menos un residuo de aminoácido fusionado al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, ya sea directa o indirectamente. En ciertas realizaciones, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones, el resto molecular comprende un péptido y/o polipéptido derivado del fragmento A2 de la toxina Shiga de una toxina Shiga de origen natural. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga efector está unido al resto molecular por al menos un enlace covalente que no es un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende un polipéptido fusionado al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga para formar un único polipéptido continuo. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula citotóxica de la invención, el motivo de la escisión por furina alterado comprende al menos una mutación con relación a una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, alterando la mutación al menos un residuo de aminoácido en la región situada originalmente 1) a 248-251 de la subunidad A de toxina de tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o la toxina Shiga (SEQ ID NO: toxina 2), o 2) a 247-250 de la subunidad A de la toxina de tipo Shiga 2 (SEQ ID NO: 3). En ciertas realizaciones adicionales de la molécula citotóxica de la invención, la mutación es una sustitución de residuo de aminoácido de un residuo de arginina por un residuo de aminoácido cargado no positivo. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula citotóxica de la invención, el

polipéptido efector de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 4-49. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula citotóxica de la invención, la primera molécula dirigida a células es capaz de mostrar una tolerabilidad *in vivo* mejorada en comparación con la segunda molécula dirigida a células. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula citotóxica de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación con relación a una subunidad A de origen natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que reduce o elimina la actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga, pero no reduce el direccionamiento subcelular al citosol, de al menos una parte del polipéptido efector de la toxina Shiga, por debajo del nivel de direccionamiento subcelular de un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica de la presente invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2 que comprende además ambas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: R248H y R251H. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende ambas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: R248H y R251H. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1 que comprende además ambas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: R248G y R251G. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende ambas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: R248G y R251G. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1 que comprende además todas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: A246G, S247A, A253G y S254A. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende todas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: A246G, S247A, R248G, R251G, A253G y S254A. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1 que comprende además todas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: A246G, S247A, R248G, R251G, A253G, y S254A. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2 que comprende además la delección de la región situada originalmente en 247-252. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende la delección de la región situada originalmente en 247-252. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2 que comprende además ambas de las siguientes delecciones: 245-247 y 253-255. En ciertas realizaciones de la molécula citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende ambas de las siguientes delecciones: 245-247 y 253-255.

En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células citotóxica de la presente invención comprende 1) una región de unión heteróloga capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular tal como se define en las reivindicaciones, 2) un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 tal como se define en las reivindicaciones, y 3) un resto molecular asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga tal como se define en las reivindicaciones; en la que la molécula dirigida a células es capaz de mostrar una estabilidad mejorada y/o una tolerabilidad *in vivo* mejorada en comparación con una segunda molécula dirigida a células que consiste en la molécula dirigida a células citotóxica, excepto por el polipéptido efector de la toxina Shiga que consiste en un polipéptido A1 de toxina Shiga de tipo salvaje; y además en la que la molécula dirigida a células citotóxica es capaz de mostrar citotoxicidad equivalente a citotoxicidad de la segunda molécula dirigida a células. Esto significa que la segunda molécula dirigida a células comprende la misma región de unión y el mismo resto molecular que la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, pero en lugar de comprender el mismo polipéptido efector de la toxina Shiga, la segunda molécula dirigida a células comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje que comprende una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y un sitio de escisión por furina de tipo salvaje en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 del polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje; en el que el resto molecular está asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje con la misma asociación que en la primera molécula dirigida a células. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, la región de unión cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular comprende la región de unión. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular comprende un péptido y/o polipéptido derivado del fragmento A2 de la toxina Shiga de una toxina Shiga de origen natural. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, la región de unión comprende un polipéptido que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, la región de unión de tipo inmunoglobulina se selecciona entre el 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<sub>H</sub>H), 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, fragmento de unión a antígeno (Fab), 10° dominio de tipo III de fibronectina derivado de fibronectina (10Fn3), dominio de tipo III de tenascina, dominio del motivo de repetición de anquirina, dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR-A), lipocalina (anticalinas), dominio Kunitz, dominio Z derivado de Proteína A, dominio derivado de cristalina gamma B, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d (affitinas), 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. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga está unido al resto molecular por al menos un enlace covalente que no es un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende al menos un residuo de aminoácido fusionado al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular comprende un polipéptido fusionado al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga para formar un único polipéptido continuo. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, 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 molécula dirigida a células es capaz de causar la muerte celular de los tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula dirigida a células en una  $CD_{50}$  que es al menos tres veces menor que el  $CD_{50}$  observado para tipos de células que no se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula dirigida a células. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, a una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente a biomoléculas diana extracelulares de la región de unión de la molécula dirigida a células, y a una segunda población de células cuyos miembros no están acoplados físicamente 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, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, 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 molécula dirigida a células, y a una segunda población de las 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, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, a una primera población de células positivas de biomolécula diana y una segunda población de células cuyos miembros no expresan una cantidad significativa de una biomolécula diana de la región de unión de la molécula dirigida a células en una superficie celular, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a células 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 adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, la región de unión es capaz de unirse a la biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EPCAMs (por ejemplo, EGP-2, EGP-40), EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, endoglina, proteína activada por fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, CD133, CEA, gpA33, mucina, TAG-72, 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, RANKL, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa humana 1 (TYRP1), proteína humana relacionada con tirosinasa 2, 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 humano, 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, CD52, CD133, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεRIa, galectina-9, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, FcεRIa, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, cD11a-c, GITRL, 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. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 4-49. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 50-61. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende además un motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL ('KDEL' descrito como SEQ ID NO: 62). En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende el motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal seleccionado del grupo que consiste en: KDEL (SEQ ID NO: 62), HDEF (SEQ ID NO: 63), HDEL (SEQ ID NO: 64), RDEF (SEQ ID NO: 65), RDEL (SEQ ID NO: 66), WDEL (SEQ ID NO: 67), YDEL (SEQ ID NO: 68), HEEF (SEQ ID NO: 69), HEEL (SEQ ID NO: 70), KEEL (SEQ ID NO: 71), REEL (SEQ ID NO: 72), KAEL (SEQ ID NO: 73), KCEL

(SEQ ID NO: 74), KFEL (SEQ ID NO: 75), KGEL (SEQ ID NO: 76), KHEL (SEQ ID NO: 77), KLEL (SEQ ID NO: 78), KNEL (SEQ ID NO: 79), KQEL (SEQ ID NO: 80), KREL (SEQ ID NO: 81), KSEL (SEQ ID NO: 82), KVEL (SEQ ID NO: 83), KWEL (SEQ ID NO: 84), KYEL (SEQ ID NO: 85), KEDL (SEQ ID NO: 86), KIEL (SEQ ID NO: 87), DKEL (SEQ ID NO: 88), FDEL (SEQ ID NO: 89), KDEF (SEQ ID NO: 90), KKEL (SEQ ID NO: 91), HADL (SEQ ID NO: 92), HAEL (SEQ ID NO: 93), HIEL (SEQ ID NO: 94), HNEL (SEQ ID NO: 95), HTEL (SEQ ID NO: 96), KTEL (SEQ ID NO: 97), HVEL (SEQ ID NO: 98), NDEL (SEQ ID NO: 99), QDEL (SEQ ID NO: 100), REDL (SEQ ID NO: 101), RNEL (SEQ ID NO: 102), RTDL (SEQ ID NO: 103), RTEL (SEQ ID NO: 104), SDEL (SEQ ID NO: 105), TDEL (SEQ ID NO: 106) y SKEL (SEQ ID NO: 107). En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, la molécula dirigida a células es capaz de mostrar una tolerabilidad *in vivo* mejorada en comparación con la segunda molécula dirigida a células. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación con relación a una subunidad A de origen natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que reduce o elimina la actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga, pero no reduce el direccionamiento subcelular al citosol de al menos una parte del polipéptido efector de la toxina Shiga por debajo del nivel de direccionamiento subcelular de un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células de la presente invención no comprende una región de unión carboxi terminal que comprende un fragmento de un receptor de superficie celular inmune. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la presente invención, la región de unión no comprende un fragmento de un coreceptor de la superficie celular humana. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la presente invención, la región de unión no comprende un fragmento de CD4 humana, una glicoproteína transmembrana de tipo-I. En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células de la presente invención no comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende los aminoácidos 1-247 de la SEQ ID NO: 2, 45-247 de la SEQ ID NO: 2, y/o 75-247 de la SEQ ID NO: 2 fusionados a una región de unión carboxi terminal que comprende un fragmento de CD4 humana que corresponde a los residuos de aminoácidos 19-183.

En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células de la presente invención, citotóxica comprende 1) una región de unión heteróloga capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular tal como se define en las reivindicaciones, 2) un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 tal como se define en las reivindicaciones, y 3) un resto molecular asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga tal como se define en las reivindicaciones; y en la que la molécula dirigida a células citotóxica es capaz de mostrar una tolerabilidad *in vivo* mejorada en comparación con la tolerabilidad *in vivo* de una segunda molécula dirigida a células que consiste en la molécula dirigida a células, excepto por el polipéptido efector de la toxina Shiga que consiste en un polipéptido A1 de toxina Shiga de tipo salvaje. Esto significa que la segunda molécula dirigida a células comprende la misma región de unión y el mismo resto molecular que la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, pero en lugar de comprender el mismo polipéptido efector de la toxina Shiga, la segunda molécula dirigida a células comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje que comprende una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y un sitio de escisión por furina de tipo salvaje en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 del polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje; en el que el resto molecular asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje con la misma asociación que en la primera molécula dirigida a células. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no es citotóxico y el resto molecular es tóxico. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, la región de unión cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular comprende la región de unión. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga está unido al resto molecular por al menos un enlace covalente que no es un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende al menos un residuo de aminoácido fusionado al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular comprende un polipéptido fusionado al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga para formar un único polipéptido continuo. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular comprende un péptido y/o polipéptido derivado del fragmento A2 de la toxina Shiga de una toxina Shiga de origen natural. Para ciertas realizaciones adicionales, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, 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 molécula dirigida a células 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 molécula dirigida a células en una  $CD_{50}$  que es al menos tres veces menor que el  $CD_{50}$  observado para tipos de células que no se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula dirigida a células. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, a una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente a biomoléculas diana extracelulares de la región de unión de la molécula dirigida a células, y a una segunda población de células cuyos miembros están no acoplados físicamente 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, tras la administración de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, 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 molécula dirigida a células, y a una segunda población de las células cuyos miembros no están acoplados físicamente a una cantidad significativa de cualquier 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, tras la administración de la molécula dirigida a células citotóxica de la invención a una primera población de células positivas de la 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 molécula dirigida a células en una superficie celular, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a células 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 de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, la región de unión comprende un polipéptido que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células, citotóxica, de la invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se selecciona entre el 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<sub>H</sub>H), dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un pez cartilaginoso, nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento V<sub>NAR</sub>, 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, fragmento de unión a antígeno (Fab), 10° dominio de tipo III de fibronectina derivado de fibronectina (10Fn3), dominio de tipo III de tenascina, dominio del motivo de repetición de anquirina, dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR-A), lipocalina (anticalinas), dominio Kunitz, dominio Z derivado de Proteína A, dominio derivado de cristalina gamma B, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d (affitinas), 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. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 4-49. En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el resto molecular comprende al menos un residuo de aminoácido fusionado al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, ya sea directa o indirectamente. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 50-61. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende además un motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL ('KDEL' descrito como SEQ ID NO: 62). En ciertas realizaciones adicionales, la molécula dirigida a células de la invención comprende el motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal seleccionado del grupo que consiste en: KDEL (SEQ ID NO: 62), HDEF (SEQ ID NO: 63), HDEL (SEQ ID NO: 64), RDEF (SEQ ID NO: 65), RDEL (SEQ ID NO: 66), WDEL (SEQ ID NO: 67), YDEL (SEQ ID NO: 68), HEEF (SEQ ID NO: 69), HEEL (SEQ ID NO: 70), KEEL (SEQ ID NO: 71), REEL (SEQ ID NO: 72), KAEL (SEQ ID NO: 73), KCEL (SEQ ID NO: 74), KFEL (SEQ ID NO: 75), KGEL (SEQ ID NO: 76), KHEL (SEQ ID NO: 77), KLEL (SEQ ID NO: 78), KNEL (SEQ ID NO: 79), KQEL (SEQ ID NO: 80), KREL (SEQ ID NO: 81), KSEL (SEQ ID NO: 82), KVEL (SEQ ID NO: 83), KWEL (SEQ ID NO: 84), KYEL (SEQ ID NO: 85), KEDL (SEQ ID NO: 86), KIEL (SEQ ID NO: 87), DKEL (SEQ ID NO: 88), FDEL (SEQ ID NO: 89), KDEF (SEQ ID NO: 90), KKEEL (SEQ ID NO: 91), HADL (SEQ ID NO: 92), HAEL (SEQ ID NO: 93), HIEL (SEQ ID NO: 94), HNEL (SEQ ID NO: 95), HTEL (SEQ ID NO: 96), KTEL (SEQ ID NO: 97), HVEL (SEQ ID NO: 98), NDEL (SEQ ID NO: 99), QDEL (SEQ ID NO: 100), REDL (SEQ ID NO: 101), RNEL (SEQ ID NO: 102), RTDL (SEQ ID NO: 103), RTEL (SEQ ID NO: 104), SDEL (SEQ ID NO: 105), TDEL (SEQ ID NO: 106) y SKEL (SEQ ID NO: 107). En ciertas realizaciones adicionales de la molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación con relación a la subunidad A de origen natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que reduce o elimina la actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga, pero no reduce el direccionamiento subcelular al citosol de al menos una parte del polipéptido efector de la toxina Shiga por debajo del nivel de direccionamiento subcelular de un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células de la presente invención, citotóxica, no comprende una subunidad B de toxina Shiga de origen natural. En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células de la invención no comprende ningún polipéptido que comprenda o consista esencialmente en un dominio de unión funcional de una subunidad B de la toxina Shiga natural. Más bien, en las moléculas dirigidas a células de la invención, las regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga están asociadas funcionalmente con regiones de unión heteróloga para efectuar el direccionamiento celular.

En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células citotóxica de la presente invención no comprende ningún fragmento A2 de la toxina Shiga de un miembro de la familia de toxinas Shiga o un fragmento funcional de la misma. En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células de la invención no comprende, carboxi terminal del motivo de escisión por furina alterado, ninguna secuencia de aminoácidos de un fragmento A2 de la toxina Shiga natural de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones, la molécula citotóxica de la presente invención no comprende ningún fragmento A2 de la toxina Shiga de un miembro de la familia de toxinas Shiga o un fragmento funcional de la misma. En ciertas realizaciones, la molécula citotóxica de la presente invención no comprende, carboxi terminal del motivo de escisión por furina alterado, ninguna secuencia de aminoácidos de un fragmento A2 de la toxina Shiga natural de tipo salvaje.

En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células de la presente invención, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2 que comprende además ambas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: R248H y R251H. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende ambas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: R248H y R251H. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1 que comprende además ambas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: R248G y R251G. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende además ambas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: R248G y R251G. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1 que comprende además todas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: A246G, S247A, A253G y S254A. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende todas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: A246G, S247A, A253G y S254A. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1 que comprende además todas de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: A246G, S247A, R248G, R251G, A253G y S254A. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende la totalidad de las siguientes sustituciones de residuos de aminoácidos: A246G, S247A, R248G, R251G, A253G, y S254A. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2 que comprende además la delección de la región situada originalmente en 247-252. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende la delección de la región situada originalmente en 247-252. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no consiste en el polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 2 que comprende además ambas de las siguientes delecciones: 245-247 y 253-255. En ciertas realizaciones de la molécula dirigida a células, citotóxica, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende ambas de las siguientes delecciones: 245-247 y 253-255.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de la invención y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se define en las reivindicaciones. La divulgación también proporciona el uso de dicha molécula o una composición que la comprende en la fabricación de tales composiciones farmacéuticas y en procedimientos de la invención, tal como se describe adicionalmente en este documento. En ciertas realizaciones de la presente invención se encuentran composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier molécula citotóxica de la presente invención y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se define en las reivindicaciones.

Más allá de las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención, los polinucleótidos capaces de codificar una molécula dirigida a células citotóxica de la presente invención, están dentro del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. La divulgación también proporciona vectores de expresión que comprenden un polinucleótido de la invención y células huésped que comprenden un vector de expresión de la divulgación. Las células huésped que comprenden un vector de expresión se pueden usar, por ejemplo, en procedimientos para la producción de una molécula de la invención (por ejemplo, polipéptido o proteína), o un componente de polipéptido o fragmento del mismo, mediante la expresión recombinante.

La presente invención también abarca cualquier molécula dirigida a células citotóxica, composición farmacéutica o composición de diagnóstico de la presente invención que se inmoviliza sobre un sustrato sólido, tal como se define en las reivindicaciones. Dichas disposiciones se pueden utilizar, por ejemplo, en procedimientos de cribado de moléculas tal como se describe en el presente documento.

La presente invención se dirige a una variedad de procedimientos, tal como se definen en las reivindicaciones.

En ciertas realizaciones de la presente invención está un procedimiento para mejorar la tolerabilidad *in vivo* y/o la estabilidad *in vitro* de una molécula dirigida a células citotóxica que comprende 1) un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y un sitio de escisión por furina proximal al extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1, tal como se define en las reivindicaciones y 2) un resto molecular heterólogo asociado con el extremo carboxilo terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga y que comprende una región de unión capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular, tal como se define en las reivindicaciones; comprendiendo el procedimiento la etapa de alterar un motivo de escisión por furina que comprende el sitio de escisión por furina. En ciertas realizaciones de este procedimiento, la etapa de alterar implica crear una mutación, truncamiento y/o modificación de grupo funcional

de aminoácido que reduce la sensibilidad a la escisión por proteasa del extremo carboxilo terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones de este procedimiento, el resto molecular heterólogo cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. La presente invención también abarca cualquier molécula, tal como se define en las reivindicaciones, que se crea mediante este procedimiento que es capaz de mostrar una tolerabilidad *in vivo* mejorada en comparación con una molécula original que comprende un motivo de escisión por furina no alterado proximal al extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención está un procedimiento *in vitro* de eliminación de una célula, que comprende la etapa de poner en contacto la célula con cualquiera de las moléculas dirigidas a células de la presente invención, citotóxicas, o la composición farmacéutica de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. La etapa de poner en contacto la célula o células se produce *in vitro*. En realizaciones adicionales de los procedimientos de eliminación de células, el procedimiento es capaz de eliminar selectivamente una célula o células (s) y/o tipos de células preferentemente sobre otra célula o células y/o tipos de células cuando se pone en contacto con 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 molécula dirigida a células o composición farmacéutica, citotóxica, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones en los pacientes. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección a tratar usando la invención se selecciona de: un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario o infección microbiana. En ciertas realizaciones, el cáncer a tratar 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 a tratar 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, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, y vasculitis.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una composición que comprende una molécula de la invención (por ejemplo, polipéptido o proteína), compuesto que comprende una molécula de la invención, o una composición de la invención (por ejemplo, composición farmacéutica), tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer, trastorno inmunitario o infección microbiana. Entre ciertas realizaciones de la presente invención está el uso de un compuesto (por ejemplo, proteína) o una composición de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, trastorno inmunitario o infección microbiana.

Ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención se pueden usar para introducir uno o más materiales exógenos adicionales en una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la molécula de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para introducir el material exógeno en el interior de una célula o células que comprende poner en contacto la célula o células *in vitro* con una molécula de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. La presente divulgación proporciona además un procedimiento para la introducción de material exógeno al interior de una célula o células en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente una molécula de la presente invención, en el que la célula o células diana están acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la molécula de la presente invención.

El uso de cualquier molécula dirigida a células, citotóxica, una composición farmacéutica, o composición de diagnóstico, tal como se define en las reivindicaciones, para el diagnóstico *in vitro*, el pronóstico y/o caracterización de una enfermedad, trastorno y/o afección está dentro de la alcance de la presente invención. Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una composición farmacéutica, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor o trastorno inmunitario. Entre ciertas realizaciones de la presente invención está el uso de una composición farmacéutica, tal como se define en las reivindicaciones, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, o trastorno inmunitario.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una composición de diagnóstico que comprende una molécula dirigida a células, citotóxica, tal como se define en las reivindicaciones, y un agente promotor de la detección para la recogida de información, tal como información útil para el diagnóstico sobre un tipo de célula, tejido, órgano, enfermedad, trastorno, condición y/o paciente.

Por ejemplo, se puede utilizar una composición de diagnóstico de la invención para detectar una célula *in vivo* mediante la administración a un sujeto mamífero de una composición que comprende la molécula de la presente invención que comprende un agente promotor de la detección y detectar la presencia de la molécula de la presente invención, ya sea *in vitro* o *in vivo*. La información recogida puede considerar la presencia de una célula acoplada

físicamente con una diana extracelular de la región de unión de la molécula de la presente invención y puede ser útil en el diagnóstico, el pronóstico, la caracterización y/o el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Ciertos compuestos (por ejemplo, polipéptidos y proteínas), composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), y los procedimientos de la invención pueden ser usados para determinar si un paciente pertenece a un grupo que responde a una composición farmacéutica de la invención.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención están kits que comprenden una molécula dirigida a células citotóxica, polinucleótido, composición farmacéutica o composición de diagnóstico de la presente invención y, opcionalmente, instrucciones de uso, y reactivo o reactivos adicionales, y/o un dispositivo o dispositivos de administración farmacéutica, tal como se define en las reivindicaciones.

Las características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y las figuras que se acompañan.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1** muestra la disposición general de ciertas moléculas de ejemplo de la invención, comprendiendo cada una un polipéptido efector de la subunidad A de toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa. Ciertas moléculas de ejemplo de la invención comprenden un polipéptido efector de la subunidad A de toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa asociado, proximal a su extremo carboxilo terminal, con un resto molecular. El "N" y "C" indican un extremo amino terminal y carboxi terminal, respectivamente, de un componente de polipéptido de la molécula.

La **Figura 2** muestra la resistencia de la escisión por furina de la molécula dirigida a células, citotóxica, de ejemplo (SLT-1A-FR::scFv-1), que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado, en comparación con una molécula dirigida a células, citotóxica, casi idéntica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un sitio de escisión por furina de tipo salvaje. La Figura 2 muestra un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie después de la electroforesis de muestras de proteínas tratadas con furina humana, purificada, recombinante o varias condiciones de control negativo. Los carriles del gel están numerados y la leyenda de la figura indica las condiciones de pretratamiento de cada muestra de molécula dirigida a células antes de la carga de muestra al gel: la temperatura en grados Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), la duración del pretratamiento en horas (indicado por "horas"), y si se añadió cualquier furina indicando la cantidad de unidades de actividad furina (U) por microgramo ( $\mu\text{g}$ ) de proteína citotóxica de la muestra (etiquetado "U/ $\mu\text{g}$  de furina") o "sin furina" para cero U/ $\mu\text{g}$  de furina. El carril marcado con "L" muestra el patrón de migración de una escalera de pesos moleculares de proteína y el tamaño aproximado de cada banda de proteínas en la escalera está marcado en kilodaltons (kDa). La leyenda de la figura indica que el polipéptido efector de la toxina Shiga estaba presente en cada muestra de molécula dirigida a células por carril, ya sea 1) un sitio de escisión por furina de tipo salvaje (WT) o 2) un motivo de escisión por furina alterado (FR). Las muestras tratadas se sometieron a 0,5 unidades de actividad de furina por microgramo de la molécula dirigida a células (U/ $\mu\text{g}$  de furina) a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 25 horas (h). La Figura 2 muestra que SLT-1A-FR::scFv-1 fue resistente a 0,5 unidades de actividad de furina por microgramo de SLT-1A-FR::scFv-1 a  $30^{\circ}\text{C}$ .

La **Figura 3** muestra la resistencia a la furina a múltiples temperaturas de la molécula dirigida a células, citotóxica, de ejemplo (SLT-1A-FR::scFv-2), que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado. La Figura 3 muestra un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie después de la electroforesis de muestras de proteínas tratadas con furina humana, purificada, recombinante o sin furina. Los carriles del gel están numerados y la leyenda de la figura indica las condiciones de pretratamiento de cada muestra de molécula dirigida a células antes de la carga de muestra al gel: la temperatura en grados Celsius ( $^{\circ}\text{C}$ ), la duración del pretratamiento en horas (indicado por "horas"), y si se añadió cualquier furina indicando la cantidad de unidades de actividad furina por microgramo de proteína citotóxica de la muestra (etiquetado "U/ $\mu\text{g}$  de furina") o "sin furina" para cero U/ $\mu\text{g}$  de furina. El carril marcado con "L" muestra el patrón de migración de una escalera de pesos moleculares de proteína y el tamaño aproximado de cada banda de proteínas en la escalera está marcado en kilodaltons (kDa). La Figura 3 muestra que SLT-1A-FR::scFv-2 fue resistente a 0,5 unidades de actividad de furina por microgramo de SLT-1A-FR::scFv-2 a temperaturas comprendidas entre  $4^{\circ}\text{C}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ .

La **Figura 4** muestra gráficamente que la molécula dirigida a células, citotóxica, resistente a la escisión por proteasa, de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-1 mostró citotoxicidad dirigida por células comparable a una molécula dirigida a células, citotóxica, casi idéntica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga con un sitio de escisión por furina de tipo salvaje. El porcentaje de viabilidad de células positivas diana se representó sobre el logaritmo en base 10 de la concentración de molécula dirigida a células administrada a las células.

La **Figura 5** muestra gráficamente que muestra gráficamente que la molécula dirigida a células, citotóxica, resistente a la escisión por proteasa, de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-1 mostró citotoxicidad no dirigida comparable a una molécula dirigida a células, citotóxica, casi idéntica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga con un sitio de escisión por furina de tipo salvaje. SLT-1A-FR::scFv-1 también mostró citotoxicidad no dirigida comparable a

una construcción de subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje no dirigida. El porcentaje de viabilidad de las células negativas diana se representó sobre el logaritmo en base 10 de la concentración de molécula dirigida a células administrada a las células.

5 La **figura 6** muestra la mejora de la supervivencia de ratones administrados con dosis repetidas de SLT-A1-FR::scFv-1 en comparación con SLT-A1-WT::scFv-1. La Figura 6 muestra las representaciones de supervivencia Kaplan-Meier de los ratones administrados con 2,5 miligramos por kilogramo de masa corporal por inyección de SLT-1A-WT::scFv-1 sensible a la escisión por proteasa o la molécula dirigida a células, citotóxica, de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-1 para un total de tres inyecciones. El eje y es el porcentaje de supervivencia de los ratones dentro de un grupo de dosificación, y el eje x está en días. Los ratones mostraron una tolerabilidad superior a la la molécula dirigida a células resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR::scFv-1 con el tiempo en comparación con su tolerabilidad de la SLT-1A-WT::scFv-1 sensible a la escisión por proteasa.

15 La **Figura 7** muestra que la molécula dirigida a células, citotóxica, de ejemplo, SLT-1A-FR::scFv-2 inhibió el crecimiento de células tumorales humanas positivas de diana *in vivo* en un modelo de xenoinjerto murino de cáncer humano. La Figura 7 muestra la carga tumoral, tal como se ensayó por bioluminiscencia, por ratón individual con el tiempo basado en la expresión de un informador de luciferasa por las células tumorales humanas. Un ratón individual está representado por cada símbolo representado en el gráfico, es decir, triángulo abierto, triángulo relleno, círculo abierto o cuadrado relleno. El eje Y es la señal de bioluminiscencia total de un ratón individual, que representa la carga tumoral, en millones de fotones por segundo (fotones/s), y el eje X es la dosis de inyección que varió de 0 a 2 miligramos de SLT 1A-FR::scFv-2 por kilogramo de masa corporal por inyección. Los cuatro grupos de dosis, eje x, corresponden a cuatro grupos de ratones. El experimento incluyó cuatro grupos de diez ratones dividido por la dosis de inyección de molécula dirigida a células citotóxica de ejemplo recibida: Grupo # 1 - ratones que recibieron cero miligramos de SLT-1A-FR::scFv-2, Grupo # 2 - ratones que recibieron 0,05 miligramos de SLT-1A-FR::scFv-2 por kilogramo de masa corporal, Grupo # 3 - ratones que recibieron 0,5 miligramos de SLT-1A-FR::scFv-2 por kilogramo de masa corporal, y el Grupo # 4 - ratones que recibieron 2 miligramos de SLT-1A-FR::scFv-2 por kilogramo de masa corporal. El experimento se llevó a cabo durante al menos 4 semanas. La Figura 7 muestra tanto la dependencia con la dosificación como con el tiempo de la inhibición del crecimiento de células tumorales humanas mostradas por la molécula dirigida a células, resistente a la escisión por proteasa, citotóxica, de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

35 La presente invención se describe más completamente en lo sucesivo usando realizaciones ilustrativas, no limitantes, y las referencias a las figuras adjuntas. La presente invención se define mediante las reivindicaciones.

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.

40 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.

45 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).

50 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).

55 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.

60 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 una 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.

65

5 Los términos "aminoácido", "residuo de aminoácido", "secuencia de aminoácidos", o secuencias de polipéptidos incluyen aminoácidos de origen natural (incluyendo isostereómeros 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 piroglutámico 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 " $\alpha$ " es la abreviatura de una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a la biomolécula después del símbolo. El símbolo " $\alpha$ " 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 Para los propósitos de la invención reivindicada, el término "asociado" o "asociación" con respecto a dos componentes moleculares se refiere al estado de los dos componentes a unir, juntar, conectar, ligar o de otra manera, acoplar para formar una sola molécula e incluye asociaciones covalentes y/o no covalentes.
- 35 Para los propósitos de la presente invención, el término "unido" se refiere a dos o más componentes moleculares asociados con una o más interacciones atómicas, de tal manera que se forma una sola molécula y en el que las interacciones atómicas incluyen al menos un enlace covalente.
- 40 Para los propósitos de la presente invención, el término "fusionado" se refiere a dos o más componentes proteínicos asociados por al menos un enlace covalente, que es un enlace peptídico. Ejemplos no limitantes de dos componentes proteínicos fusionados incluyen, por ejemplo, un aminoácido, péptido o polipéptido fusionado a un polipéptido mediante un enlace peptídico, de manera que la molécula resultante es un polipéptido único continuo.
- El símbolo "::" significa las regiones de polipéptidos antes y después de que se fusionen entre sí para formar un polipéptido continuo.

Para los propósitos de la presente invención, el término "efector" significa proporcionar una actividad biológica, tal como citotoxicidad, señalización biológica, catálisis enzimática, ruta subcelular y/o unión intermolecular, que da lugar al reclutamiento de un factor o factores y/o efecto o efectos alostéricos.

5 Para los propósitos de la presente invención, la frase "polipéptido efector de la toxina Shiga", "polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga", "región efectora de la toxina Shiga" o "región de polipéptido efector de la toxina Shiga" se refiere a un polipéptido derivado 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 la toxina Shiga incluyen, por ejemplo, promover la entrada celular, deformar las membranas lipídicas, estimular la endocitosis  
10 mediada por clatrina, dirigir su propio direccionamiento subcelular, dirigir su propio transporte retrógrado, evitar la degradación intracelular, inactivar catalíticamente los ribosomas, lograr la citotoxicidad y lograr efectos citostáticos.

Para los propósitos de la presente invención, la frase "derivado de" significa que el polipéptido comprende secuencias de aminoácidos halladas originalmente en una proteína y que ahora puede comprender adiciones,  
15 deleciones, truncamientos, u otras alteraciones de la secuencia original de tal manera que la función y la estructura general se conservan sustancialmente. El trabajador experto será capaz de identificar la molécula original de la que deriva una región de polipéptido derivada utilizando técnicas conocidas en el sector, por ejemplo, software de alineación de secuencias de polipéptidos.

20 Para los propósitos de la presente invención, el término "fragmento de región A1 de toxina Shiga" se refiere a una región de polipéptido que consiste esencialmente en un fragmento A1 de la toxina Shiga y/o derivado de un fragmento A1 de la toxina Shiga de una toxina Shiga.

Para los propósitos de la presente invención, el término "heterólogo" significa de una fuente diferente que una holotoxina Shiga, por ejemplo un resto molecular o polipéptido heterólogo es uno que no se encuentra de forma  
25 nativa como parte de o unido a una subunidad A de origen natural de una toxina Shiga natural expresada por una especie bacteriana de origen natural.

Para los propósitos de la presente invención y con respecto a las asociaciones entre los componentes de una molécula de la presente invención, el término "enlace disulfuro" incluye enlaces disulfuro simétricos y enlaces  
30 disulfuro asimétricos.

Para los propósitos de la presente invención, la frase "región carboxi terminal de un fragmento A1 de la toxina Shiga" se refiere a una región de polipéptido derivada de un fragmento A1 de toxian Shiga de origen natural, comenzando la  
35 región con un residuo hidrófobo (por ejemplo, V236 de StxA-A1 y SLT-1A1, y V235 de SLT-2A1) que va seguido por un residuo hidrófobo y terminando la región con el sitio de escisión por furina conservado entre polipéptidos de fragmento A1 de la toxina Shiga y terminando en la unión entre el fragmento A1 y el fragmento A2 en subunidades A de la toxina Shiga A nativas. Para los propósitos de la presente invención, la región carboxi terminal de un fragmento A1 de toxina Shiga incluye una región de péptido derivada del extremo carboxi terminal de un polipéptido de  
40 fragmento A1 de la toxina Shiga, tal como, por ejemplo, una región de péptido que comprende o consiste esencialmente en el extremo carboxi terminal de un fragmento A1 de la toxina Shiga. Los ejemplos no limitantes de regiones peptídicas derivadas del extremo carboxi terminal de un fragmento A1 de la toxina Shiga incluyen las secuencias de residuos de aminoácidos situadas originalmente desde la posición 236 a la posición 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248 , 249, 250, o 251 en StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-1A (SEQ ID NO: 1); y desde la  
45 posición 235 a la posición 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, o 250 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3).

Para los propósitos de la presente invención, el término "proximal" al extremo carboxi de un polipéptido de fragmento A1 con respecto a un resto molecular asociado se refiere a la distancia molecular de doce residuos de aminoácidos o menos del residuo de aminoácido que define el último residuo en la región de polipéptido del fragmento A1.  
50

Para los propósitos de la presente invención, la frase "que cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1" incluye cualquier resto molecular de un tamaño de 4,5 kDa o mayor unido covalentemente a un residuo de aminoácido en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1, tal como, por ejemplo, el residuo de aminoácido derivado del residuo de aminoácido situado originalmente en  
55 cualquiera de las posiciones 236 a 251 en StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o 235-250 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3). Para los propósitos de la presente invención, la frase "que cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1" también incluye cualquier resto molecular de un tamaño de 4,5 kDa o mayor unido covalentemente a un residuo de aminoácido en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1, tal como, por ejemplo, el residuo de aminoácido carboxi terminal al último aminoácido de la región derivada del fragmento A1 o el polipéptido efector de la toxina Shiga. Para los propósitos de la presente invención, la frase "que cubre estéricamente el extremo carboxi temrnal de la región derivada del fragmento A1" también incluye cualquier resto molecular de un tamaño de 4,5 kDa o mayor que previene físicamente el reconocimiento celular del extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1, tal como, por ejemplo, reconocimiento por la maquinaria ERAD.  
60

65 Para los propósitos de la invención reivindicada, la frase "motivo de escisión por furina en el extremo carboxi

terminal de la región del fragmento A1" se refiere a un motivo específico de escisión por furina conservado entre las subunidades A de la toxina Shiga y que es un puente de unión entre el fragmento A1 y el fragmento A2 en subunidades A de la toxina Shiga nativa.

5 Para los propósitos de la presente invención, la frase "sitio de escisión por furina proximal al extremo carboxi de la región del fragmento A1" se refiere a cualquier sitio identificable de escisión por furina que tiene un residuo de aminoácido dentro de los siete residuos de aminoácidos o menos del residuo de aminoácido que define el último residuo en la región del fragmento A1.

10 Para los propósitos de la presente invención, una función efectora de la toxina Shiga es una actividad biológica conferida por un polipéptido derivado de una subunidad A de la toxina Shiga. Los ejemplos no limitativos de funciones efectoras de la toxina Shiga incluyen la internalización celular, direccionamiento 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 toxinas Shiga son proteínas inactivantes de ribosomas (RIPs). 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, Toxicol 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 (Erica A et al, Antimicrob Agents Chemother 37: 835-8 (1993); Au T et al, FEBS Lett 471: 169-72 (2000); Parikh B, Tumer 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.

30 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 polipéptido efector 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.

40 Para los propósitos de la presente invención y con respecto a la función efectora de la toxina Shiga de una molécula de la presente invención, el término "actividad razonable" se refiere a un nivel de actividad de una actividad biológica efectora de la toxina Shiga igual o mayor a un nivel de actividad mínimo definido con referencia al nivel de actividad efectora de la toxina Shiga de un polipéptido que comprende solamente secuencias de polipéptidos de la toxina de Shiga de tipo salvaje. Para la función efectora de citotoxicidad de la toxina Shiga, un nivel razonable de actividad incluye estar dentro de 500 veces de una molécula que comprende una construcción de la toxina Shiga de tipo salvaje y, si se observa, cualquier otra estructura o estructuras moleculares.

50 Tal como se usa en el presente documento, la exhibición 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 polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje que comprende un fragmento A1 de longitud completa de la toxina Shiga. Para la inhibición *in vitro* de ribosoma, una función efectora de la toxina Shiga significativa es mostrar una  $IC_{50}$  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  $IC_{50}$  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  $CD_{50}$  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 solo, sin una región de unión de reconocimiento celular, que tiene una  $CD_{50}$  de 100-10.000 nM, dependiendo de la línea celular.

60 Cabe señalar que incluso si la citotoxicidad de un polipéptido efector de la toxina Shiga se reduce con relación a un efector de la toxina Shiga de tipo salvaje, en la práctica, las aplicaciones usando polipéptidos efectores de toxina Shiga atenuadas pueden ser igual o más eficaces que los que utilizan polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje porque las variantes de más alta potencia podrían exhibir efectos indeseables que se minimizan o reducen 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 40 moléculas que se

65

internalizan (Tam P, Lingwood C, Microbiology 153: 2700-10 (2007)). Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga con incluso funciones efectores de la toxina Shiga considerablemente reducidas, tales como, por ejemplo, direccionamiento subcelular o citotoxicidad, en comparación con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje, pueden todavía ser lo suficientemente potentes para aplicaciones prácticas que implican la eliminación de células diana y/o detección de ciertos compartimentos subcelulares de tipos de células específicos.

Para algunas muestras, los valores exactos, ya sea para IC<sub>50</sub> o CD<sub>50</sub>, podrían ser imposibles de obtener debido a la incapacidad para recoger los puntos de datos requeridos para una curva de ajuste preciso. Valores de IC<sub>50</sub> y/o CD<sub>50</sub> 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 IC<sub>50</sub> ni CD<sub>50</sub> 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, direccionamiento subcelular y/o actividad enzimática. Los ensayos para las funciones efectoras de la toxina Shiga pueden no requerir mucho de la molécula 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 del polipéptido y/o estabilidad 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, los 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 direccionamiento 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 direccionamiento 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 direccionamiento subcelular en comparación con el polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje apropiado. Sin embargo, si un polipéptido efector de la toxina Shiga de la invención exhibe citotoxicidad equivalente a una construcción de subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, entonces el nivel de actividad del direccionamiento subcelular se infiere que es equivalente al nivel de actividad de direccionamiento subcelular de una construcción de subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje.

El término "citotoxicidad selectiva" con respecto a la actividad citotóxica de una molécula citotóxica se refiere a los niveles relativos de citotoxicidad entre una población de células diana y una población de células no diana presenciales, que pueden expresarse como una relación de la concentración citotóxica media-máxima (CD<sub>50</sub>) para un tipo de célula diana sobre el CD<sub>50</sub> para un tipo de célula no diana para mostrar preferencialidad de eliminación celular del tipo de célula diana.

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 Decket 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 moléculas dirigidas a células 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 molécula dirigida a células 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 total de la superficie celular 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 proporciona moléculas resistentes a la escisión por proteasa que comprenden efectores de la subunidad A de la toxina Shiga con motivos de escisión por furina alterados que son capaces de exhibir citotoxicidad de la toxina Shiga de tipo salvaje, tal como se define en las reivindicaciones. Anteriormente, las construcciones de fusión de subunidad A de la toxina Shiga mostraron ser citotóxicas y capaces de auto-dirigir su propio enrutamiento intracelular para liberar un fragmento de toxina enzimáticamente activo al citosol (Backer M et al, J Control Release. 74: 349-55 (2001); Backer M, Backer J, Bioconjug Chem 12: 1066-1073 (2001)); sin embargo, se creía que el mantenimiento del sitio de escisión por furina era importante para mantener la citotoxicidad máxima.

En el diseño de las construcciones sintética de la subunidad A de la toxina Shiga, se debe considerar el mecanismo natural de intoxicación de la toxina Shiga, tal como, por ejemplo, la liberación del fragmento A1 a través de la proteólisis intracelular por furina y la retrotranslocación del fragmento A1 al citosol. La eliminación de todos los restos moleculares carboxi terminal al fragmento A1 de la toxina Shiga podría ser necesaria tanto para 1) exponer el extremo carboxi terminal del fragmento A1 al reconocimiento por factores celulares dentro del retículo endoplásmico de las células intoxicadas para promover el direccionamiento eficiente al citosol, como para 2) maximizar la actividad catalítica a medida que el fragmento A1 se repliega en una estructura en el citosol en ausencia de cualquier resto carboxi terminal. Todos estos mecanismos podrían contribuir a la máxima citotoxicidad de la toxina Shiga observada para toxinas Shiga de tipo salvaje.

Dado que el procesamiento proteolítico por furina de subunidades A de la toxina Shiga de holotoxinas Shiga en células de vertebrados intoxicados es crítica para la citotoxicidad eficaz, se pensó que la escisión por furina debe mantenerse o compensarse para este procesamiento proteolítico de origen natural con el fin de conservar el direccionamiento eficiente, nativo, subcelular y la activación catalítica del mecanismo de citotoxicidad de la toxina Shiga altamente evolucionado y potente. La separación del fragmento A1 de la toxina Shiga del fragmento A2 se debe mantener, mimetizar o compensar de otro modo para 1) producir un extremo carboxi terminal del fragmento A1 o un extremo carboxi terminal que se parece a un fragmento A1 natural accesible en el retículo endoplásmico para el transporte eficiente para el citosol y 2) liberar una estructura de fragmento A1 catalítico estable y óptimo al citosol.

Anteriormente, no ha habido ninguna demostración de una estructura derivada de la subunidad A de la toxina Shiga que comprende un resto carboxi terminal heterólogo y que carece de un evento de escisión por furina, pero que todavía exhibe una citotoxicidad máxima de la toxina Shiga de tipo salvaje en términos de eficiencia y potencia. En particular, no había estructura derivada de la subunidad A de la toxina Shiga conocida que evite el procesamiento proteolítico para la máxima citotoxicidad de la toxina Shiga cuando el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga se unía covalentemente a y se cubría estéricamente por un resto molecular relativamente grande, tal como, por ejemplo, una región de unión de tipo inmunoglobulina dirigida a células.

Sorprendentemente, las moléculas de ejemplo de la presente invención que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga con motivos de escisión por furina alterados mostraron funciones efectoras suficientes de la toxina Shiga para proporcionar una citotoxicidad máxima de la toxina Shiga de tipo salvaje, mientras que permite simultáneamente la unión de restos moleculares relativamente grande (mayor que 28 kDa) a sus extremos terminales carboxi (véase Ejemplos, infra). Tal como se describe en detalle en los Ejemplos a continuación, las moléculas de ejemplo de la presente invención, comprendiendo cada una un polipéptido derivado de la subunidad A de la toxina Shiga que comprende un dominio catalítico, exhiben potencia y eficiencia citotóxica de la toxina Shiga comparable a moléculas dirigidas a células que comprenden polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga escindible por furina, tales como los polipéptidos de la subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje. No hubo necesidad de ninguna modificación adicional de una característica compensatoria, por ejemplo, tal como la adición de un sitio de escisión por proteasa ectópico. Estas observaciones conducen al diseño de moléculas dirigidas a células mejoradas que comprenden polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa, en que las moléculas exhiben citotoxicidad equivalente a moléculas dirigidas a células que comprenden un fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje.

La presente invención proporciona moléculas resistentes a la escisión por proteasa que comprenden polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga que comprende motivos de escisión por furina alterados, tal como se define en las reivindicaciones. Las moléculas citotóxicas de la presente invención que comprende 1), un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa catalíticamente activo y/o 2) un resto molecular citotóxico puede ser utilizado en aplicaciones para matar células. Las moléculas de la presente invención que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa catalíticamente activos se pueden usar como componentes de inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina para la eliminación selectiva de tipos de células específicos y el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo cánceres, trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas. Las moléculas que se dirigen a células de la presente invención tienen varios usos, por ejemplo, para la eliminación de células diana, la liberación de materiales exógenos en tipos de células específicos, obtención de información de diagnóstico, y como agentes terapéuticos para el tratamiento de

una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluyendo cánceres, trastornos del sistema inmunitario y las infecciones microbianas. Las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención también son útiles para aplicaciones que implican la eliminación selectiva de tipos de células específicos y el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, trastornos del sistema inmunitario y las infecciones microbianas. La presente invención también proporciona una forma específica de modificar moléculas derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga, por ejemplo, inmunotoxinas o fusiones de ligando-toxina, que comprende un resto molecular carboxi terminal a una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que implica alterar el motivo de escisión por furina en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga.

#### 10 I. Estructura general de moléculas citotóxicas y moléculas dirigidas a células de la invención

La presente invención proporciona varias moléculas dirigidas a células, citotóxicas, comprendiendo cada una de las moléculas un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende una región derivado del fragmento A1 de toxina Shiga y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga, tal como se define en las reivindicaciones. Las moléculas dirigidas a células de la presente invención, citotóxicas, son resistentes a la escisión por furina en comparación con moléculas relacionadas que comprenden de fragmentos A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje. Además de ser resistentes a la escisión por furina, las moléculas de la invención son generalmente más resistentes a la escisión por proteasa y, por lo tanto, exhiben una estabilidad mejorada y/o tolerabilidad *in vivo* mejorada, tal como se define en las reivindicaciones; y pueden exhibir otras propiedades deseables, tales como, por ejemplo, toxicidades *in vivo* disminuidas, semividas de almacenamiento aumentada y/o semividas *in vivo* aumentada.

Las moléculas citotóxicas de la presente invención también comprenden un resto molecular asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, tal como se define en las reivindicaciones. Un ejemplo de un resto molecular es una región de unión, de tipo inmunoglobulina, que reconoce una célula que comprende uno o más polipéptidos que se unen con alta afinidad a una biomolécula de la superficie celular.

Las moléculas dirigidas a células de la presente invención también comprenden una región de unión capaz de 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. La unión de las regiones de unión que reconocen una célula con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga descrita en este documento permite la modificación del direccionamiento específico de tipos de células de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga a pesar de la falta de procesamiento proteolítico por furina de la región de polipéptido derivada de una subunidad A de la toxina Shiga. Esta estructura general de las moléculas dirigidas a células de la presente invención es modular en que cualquier número de diversas regiones de unión dirigidas a células pueden estar asociadas a varios polipéptidos efectores de la toxina Shiga efectoras, resistentes a la escisión por furina, para producir variaciones de la misma estructura general.

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que la alteración de un sitio de furina proteasa que une de forma nativa el fragmento A1 de la toxina A1 Shiga al fragmento A2 no disminuyó su citotoxicidad cuando se unió a un resto molecular carboxi terminal relativamente grande (mayor que 28 kDa). Sorprendentemente, la citotoxicidad máxima de la toxina Shiga de tipo salvaje es posible en ausencia de un evento de escisión de furina a pesar de la presencia de un resto carboxi terminal grande que pueda interferir con un mecanismo natural de la subunidad A de la toxina Shiga de deshacerse de todos los otros restos moleculares grandes para exponer un dominio hidrófobo carboxi terminal que conduce a 1) el reconocimiento del extremo carboxi terminal del fragmento A1 por el sistema ERAD, 2) despliegue del fragmento A1, 3) la ubiquitinación del fragmento A1, 4) retrotranslocación del dominio catalítico de la retículo endoplásmico al citosol, 5) evitar la degradación del dominio catalítico por el proteasoma, y 6) el repliegamiento de un dominio catalítico que comprende el polipéptido para formar una estructura enzimática totalmente activa (ver Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998); LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Yu M, Haslam D, Infect Immun., 73: 2524-32 (2005); Falguieres T, Johannes L, Biol Cell 98: 125-34 (2006); Di R et al, Toxicon 57: 52 5-39 (2011); Li S, PLoS One 7: e41119 (2012)).

Antes del descubrimiento descrito en el presente documento, se pensaba, sin embargo, que en el diseño de las proteínas de fusión derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga destinado a tener una citotoxicidad óptima, el evento de escisión por furina dentro de la subunidad A de la toxina Shiga debe mantenerse o compensarse. Mediante el mantenimiento de un evento de escisión por furina dentro de la región derivada de la subunidad A de la toxina Shiga, un polipéptido del tipo del fragmento A1 de la subunidad A de la toxina Shiga puede ser liberado desde cualquier resto asociado con su extremo carboxi terminal y que está cubriendo estéricamente el extremo carboxi terminal del fragmento A1 con el fin de mejorar la actividad de inhibición de ribosoma de la molécula entera en 60 veces o más (ver Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999)). A continuación, el extremo carboxi terminal liberado del polipéptido de tipo fragmento A1 puede señalar con su dominio hidrófobo a la maquinaria ERAD de la célula intoxicada para la translocación desde el lumen del retículo endoplásmico al citosol, el polipéptido de tipo fragmento se puede desplegar, un polipéptido que comprende un dominio catalítico de Shiga puede ser translocado eficientemente al citosol y el dominio catalítico se puede replugar en una confirmación activa en el citosol similar a como ocurre para la toxina Shiga de tipo salvaje. Además, si una región de tipo fragmento A2 estaba presente en la proteína de fusión, entonces el fragmento A1 podría resultar más catalíticamente activado después de la disociación

de cualquier región del tipo de fragmento A2. Alternativamente, la compensación por la falta de un evento de escisión por furina podría lograrse mediante la presentación del polipéptido derivado de la subunidad A de la toxina Shiga A en una forma "pre-procesada" proximal a un extremo carboxi terminal de la proteína de fusión, de tal manera que el extremo carboxi terminal de la molécula mimetiza el fragmento A1 de la toxina Shiga escindida por furina.

#### A. Polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa

Todas moléculas dirigidas a células, citotóxicas, de la presente invención comprenden cada una un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por furina, tal como se define en las reivindicaciones. Estos polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por furina, están cada uno derivado de una subunidad A del miembro de la familia de toxinas Shiga y comprenden 1) un polipéptido derivado de un fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y 2) un motivo de escisión por furina alterado en el carboxilo terminal de la región del polipéptido del fragmento A1 de la toxina Shiga.

Para los propósitos de la presente invención, la frase "resistente a la escisión por furina" significa que la región de polipéptido exhibe menos escisión por furina que un extremo carboxilo terminal de un fragmento A1 de la toxina Shiga en una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje o un extremo carboxilo terminal de la región derivad del fragmento A1 de la toxina Shiga de la construcción en la que el motivo de escisión por furina natural está inalterado, es decir, comprende solamente secuencias de origen natural de tipo salvaje tal como se muestra por subunidades A de la toxina Shiga naturales en la región del polipéptido análogo.

Un polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido derivado de una subunidad A de la toxina Shiga de un miembro de la familia de toxinas Shiga. La familia de toxinas Shiga de toxinas proteicas se compone de varias toxinas de origen natural que están estructuralmente y funcionalmente relacionadas, por ejemplo, toxina Shiga, toxina de tipo Shiga 1 y toxina de tipo Shiga 2 (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparten la misma estructura general y el 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)).

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 SLT-I) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica, 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, Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)). Aunque las variantes SLT1 y SLT2 variantes son sólo alrededor del 53-60% similares entre sí a nivel de secuencia de aminoácidos, comparten mecanismos de la actividad enzimática y la citotoxicidad común a los miembros de la familia de toxinas Shiga (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Se han descrito más de 39 diferentes toxinas Shiga, tal como los subtipos definidos Stxla, Stxlc, Stxld, 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 cualquier especie bacteriana porque los genes que codifican toxinas Shiga pueden propagarse entre las especies bacterianas a través de transferencia génica horizontal (Strauch E et al, Infect Immun 69: 7588-95 (2001); Bielaszewska M. et al., Appl Environ Microbiol 73: 3144-50 (2007); Zhaxybayeva O, Doolittle W, Curr Biol 21: R242-6 (2011)). Como un ejemplo de transferencia entre especies, una toxina Shiga fue descubierta en una cepa de *A. haemolyticus* aislada de un paciente (Grotiuz G et al, J Clin Microbiol. 44: 3838-41 (2006)). Una vez que un polinucleótido que codifica una toxina Shiga entra en una nueva subespecie o especie, la secuencia de aminoácidos de la toxina Shiga se presume que 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)).

La subunidades A de la toxina Shiga A de los miembros de la familia de toxinas Shiga comprenden un sitio de escisión por furina conservado en los extremos carboxilo de sus regiones de los fragmentos A1 importantes para la función de la toxina Shiga. Los motivos del sitio escisión por furina y sitios de escisión por furina pueden ser identificados por el trabajador experto y/o mediante el uso de la información en este documento.

Los motivos de consenso en sustratos escindidos por furina se han identificado con cierto grado de especificidad. Se ha descrito un motivo del sitio de escisión por furina que comprende una región de 20 residuos de aminoácidos que pueden estar marcados P14 a P6' (Tian S, Biochem Insights 2: 9-20 (2009); Tian S, Jianhua W, Int J Biol Sci 6: 89-95 (2010); Tian S et al, Int J Mol Sci 12: 1060-5 (2011); Tian S et al, Sci Rep 2: 261 (2012)) usando la nomenclatura descrita en Schechter I, Berger, A, Biochem Biophys Res Commun 32: 898-902 (1968). De acuerdo con esta nomenclatura, el sitio de escisión está en el enlace carboxilo del residuo de aminoácido designado P1 y los residuos están numerados P2, P3, P4, etc, en la dirección que va hacia el extremo amino terminal de este residuo de referencia P1. Los residuos que van hacia el extremo carboxilo terminal desde el residuo de referencia P1 se numeran con la notación prima P2', P3', P4', etc.

Un sitio de escisión por furina general se describe a menudo por el motivo de consenso R-x-x-R que se corresponde con P4-P3-P2-P1; donde "R" representa un residuo de arginina (véase la Tabla A, supra), un guión "-" representa un enlace peptídico, y una "x" minúscula representa cualquier residuo de aminoácido (Schalken J et al, J Clin Invest 80: 1545-9 (1987); Bresnahan P et al, J Cell Biol. 111: 2851-9 (1990); Hatsuzawa K et al, J Biol Chem. 265: 22075-8 (1990); Wise R et al, Proc Natl Acad Sci USA 87: 9378-82 (1990); Molloy S et al, J Biol Chem 267: 16396-402 (1992)). Sin embargo, otros residuos y posiciones pueden ayudar a definir aún más motivos de escisión por furina (Hosaka M et al, J Biol Chem 266: 12127-30 (1991); Oda K et al, Biochem Biophys Res Commun 179: 1181-6 (1991); Leduc R et al, J Biol Chem. 267: 14304-8 (1992); Watanabe T et al, J Biol Chem 267: 8270-4 (1992)). Un motivo del sitio de escisión por furina ligeramente más refinado se denomina con frecuencia como el motivo de consenso R-x-[K/R]-R (donde una barra diagonal "/" significa "o" y divide los residuos de aminoácidos alternativos en la misma posición), que corresponde a P4-P3-P2-P1, porque se observó que la furina tiene una fuerte preferencia por la escisión de sustratos que contienen este motivo (véase Rockwell N et al, Chem Rev 102: 4525-48 (2002); Remacle a et al., J Biol Chem 283: 20897-906 (2008); Tian S, Biochem Insights 2: 9-20 (2009); Tian S, Jianhua W, Int J Biol Sci 6: 89-95 (2010); Tian S et al., Int J Mol Sci 12: 1060-5 (2011); Tian S et al, Sci Rep. 2: 261 (2012)).

Consistente con esto, muchos inhibidores de furina comprenden péptidos que comprenden el motivo R-x-x-R (véase, por ejemplo Misumi Y et al, Biochem Biophys Res Commun 171: 236-42 (1990); Hallenberger S et al, Nature 360: 358-61 (1992); Garten W et al, Biochimie 76: 217-25 (1994); Angliker H, J Med Chem. 38: 4014-8 (1995); Van Rompaey L et al, Biochem J 326: 507-514 (1997); Cameron A et al, J Biol Chem 275: 36741-9 (2000); Jean F et al, Proc Natl Acad Sci USA 97: 2864-9 (2000); Basak A, Lazure C, Biochem J 373: 231-9 (2003); Kacprzak M et al, J Biol Chem 279: 36788-94 (2004)). Un ejemplo de un inhibidor sintético de la furina es R-V-K-R (véase, por ejemplo Henrich S et al, Nat Struct Biol. 10: 520-6 (2003)). En general, un polipéptido que comprende un motivo de aminoácido dibásico de superficie accesible con dos aminoácidos cargados positivamente separados por dos residuos de aminoácidos, puede ser predicho para ser sensible a la escisión por furina con la escisión produciéndose en el enlace carboxi del último aminoácido básico en el motivo (Rockwell N et al, Chem Rev 102: 4525-48 (2002); Remacle a et al, J Biol Chem 283: 20897-906 (2008)).

Además del sitio de escisión por furina mínimo R-x-x-R, se ha descrito un motivo de sitio escisión por furina más grande con ciertas preferencias de residuos de aminoácidos en ciertas posiciones. Mediante la comparación de diversos sustratos de furina conocidos, ciertas propiedades fisicoquímicas se han caracterizado por los residuos de aminoácidos en un motivo de sitio de escisión por furina de 20 aminoácidos de largo. La región P6 a P2' del motivo de escisión por furina delinea el sitio de escisión por furina central que interacciona físicamente con el dominio enzimático de la furina. Las dos regiones flanqueantes P14 a P7 y P3' a P6' son a menudo hidrófilas, siendo ricas en residuos de aminoácidos polares para aumentar la accesibilidad de la superficie del sitio de escisión por furina central situado entre ellas.

En general, la región de motivo de escisión por furina desde la posición P5 a P1 tiende a comprender residuos de aminoácidos con una carga positiva y/o altos puntos isoeléctricos. En particular, la posición P1, que marca la posición de la proteólisis de furina, es generalmente ocupado por una arginina, pero otros, residuos de aminoácidos cargados positivamente se puede producir en esta posición. Posiciones P2 y P3 tienden a ser ocupado por los residuos de ácido flexibles, amino, y, en particular P2 tiende a ser ocupado por arginina, lisina, o, a veces por muy pequeños y flexibles residuos de aminoácidos como la glicina. La posición P4 tiende a ser ocupado por cargados positivamente, residuos de aminoácidos en sustratos de furina. Sin embargo, si la posición P4 está ocupada por un resto alifático, residuo de aminoácido, entonces la falta de un grupo cargado positivamente, funcional puede ser compensada por un residuo cargado positivamente situado en la posición (s) P5 y/o P6 (Tian S, Jianhua W, Int J Biol Sci 6: 89-95 (2010)). Posiciones P1' y P2' son comúnmente ocupadas por residuos de aminoácidos hidrófobos alifáticos y/o, con la posición P1' más comúnmente siendo ocupado por una serina (Tian S, Biochem Insights 2: 9-20 (2009); Tian S et al., Sci Rep 2: 261 (2012)).

Los dos, hidrófilas, regiones flanqueantes tienden a ser ocupado por los residuos de aminoácidos que son polar, hidrófilo, y/o tienen grupos funcionales de aminoácidos más pequeñas; Sin embargo, en ciertos sustratos furina verificadas, las regiones flanqueantes del núcleo motivo escisión por furina no contienen ningún consenso, residuos hidrófilos, aminoácidos (ver Tian S, Biochem Insights 2: 9-20 (2009)). En los motivos de escisión por furina de algunas proteínas virales, las posiciones P3' a P6' están ocupadas por residuos de aminoácidos con grupos pequeños, hidrófobos, funcionales, tales como, por ejemplo, alaninas, glicinas, y prolinas (Tian S, Biochem Insights 2: 9-20 (2009); Tian S et al, Sci Rep 2: 261 (2012)). Aunque no es necesario para la proteólisis de furina, la presencia de carga positiva, el residuo de aminoácido (s) en la posición P5 y/o P6 podría aumentar la eficiencia de la escisión por furina. En toxina Shiga A Subunidades, el motivo de escisión por furina conservado localizado en la unión de la toxina fragmento A1 Shiga y el fragmento A2 podría haber optimizado funciones en competencia, tales como, por ejemplo, el equilibrio eficiente escisión por furina con la exposición de un parche no estructurada, hidrófoba en el extremo carboxi terminal del fragmento A1 después de la escisión.

Las moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden cada uno un polipéptido toxina Shiga efector que comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi de la región del fragmento A1.

Para los propósitos de la invención reivindicada, el término "sitio de escisión por furina" se refiere a un mínimo, la

escisión por furina consenso sitio R/YxxR en el bucle sensible a proteasa de la toxina Shiga A subunidades.

Para los propósitos de la presente invención, el término "escisión por furina motivo" se refiere a un polipéptido que consiste esencialmente en un veinte, residuo de aminoácido, la secuencia de polipéptido de consenso (P14 a P6' ) como se describe en el presente documento, que comprende 1) un mínimo, furina -cleavage motivo P4 a P1, 2) un núcleo, escisión por furina motivo P6 a P2' , y 3) dos, flanqueando, regiones de polipéptidos P14 a P7 y P3' a P6' .

Para los propósitos de la presente invención, un "interrumpida escisión por furina motivo" es una alteración de uno o más residuos de aminoácidos derivados de la región residuo de ácido 20 amino que es un motivo de escisión por furina se encuentra en nativo, toxina Shiga A Subunidades en el unión entre el fragmento de la toxina A1 de Shiga y regiones del fragmento A2 y posicionado de tal manera que la escisión por furina de una toxina Shiga a resultados de subunidades en la producción de los fragmentos A1 y A2, en el que las exposiciones de motivos de escisión por furina alterados redujeron de escisión de furina en comparación con una molécula de referencia que comprende una de tipo salvaje, región del fragmento de toxina Shiga A1 fusionado a un polipéptido carboxi terminal de un tamaño lo suficientemente grande como para controlar la escisión de furina mediante el ensayo apropiado. Una reducción en la escisión de furina puede ser determinada por el experto en la materia usando ensayos conocidos en la técnica y/o descrita en el presente documento. Por ejemplo, una reducción en la escisión de furina de una molécula en comparación con una molécula de referencia se puede determinar usando un, ensayo de escisión de furina *in vitro* des cribed en los Ejemplos siguientes, llevada a cabo usando las mismas condiciones, y luego realizar una cuantificación de la banda de densidad de los fragmentos resultantes de la escisión. En ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención, el motivo de escisión por furina alterada exhibe una reducción en *in vitro* furina escisión del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% o mayor en comparación con una molécula de referencia que comprende una de tipo salvaje, un fragmento de toxina Shiga A1 fusionada en su extremo carboxilo terminal a un polipéptido, tal como, por ejemplo, la molécula de referencia SLT-1A-WT::scFv-1 describe en los Ejemplos.

El residuo de ácido motivo escisión por furina de 20 aminoácidos encontrados en las nativas, la toxina Shiga subunidades en la unión entre la toxina fragmento A1 Shiga y el fragmento A2 motivo escisión por furina está bien caracterizado en ciertas toxinas Shiga. Por ejemplo, en stxA (SEQ ID No: 2) y SLT-1A (SEQ ID NO: 1), este motivo de escisión por furina se coloca de forma nativa de L238to F257, y en SLT-2A (SEQ ID NO: 3), este furina motivo -cleavage se posiciona de forma nativa de V237 a Q256. Basado en la homología de aminoácidos, experimento, y/o ensayos de tipo furina escisión descritos en el presente documento, el trabajador experto puede identificar motivos de escisión por furina en otra nativa, la toxina de Shiga subunidades, donde los motivos se prevé que resultará en la producción de A1 y A2 fragmentos después de la escisión por furina de esos toxina Shiga a Subunidades por una célula eucariota intoxicado.

Alteraciones a un residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina incluyen diversas mutaciones, así como modificaciones post-traducción, tales como, por ejemplo, la glicosilación y similares, que implican la vinculación de una molécula voluminosa para el grupo funcional de un residuo de aminoácido. Una mutación a un residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina incluye una delección, inserción, inversión, sustitución, y/o truncamiento carboxi terminal del motivo escisión por furina. Debido a que ha sido alterado, ciertos motivos furina-división alterados no pueden ser fácilmente reconocible por estar relacionados con cualquier motivo furina-división; sin embargo, el extremo carboxi de la región del fragmento A1 toxina Shiga será reconocible y definirá donde estaría ubicado el motivo escisión por furina si no fuera alterado. Por ejemplo, un motivo de escisión por furina alterado puede comprender menos de los veinte, residuos de aminoácidos del motivo de escisión por furina y representa un truncamiento carboxi terminal en comparación con una toxina Shiga Una de las subunidades y/o fragmento A1 toxina Shiga.

Para los propósitos de la presente invención con respecto a un sitio de escisión por furina o escisión por furina motivo, el término "interrupción", "alterar", o "alterado" se refiere a una alteración del sitio de escisión por furina de origen natural, tales como, por ejemplo, una mutación, que se traduce en una reducción de la escisión por furina en el sitio en comparación con un tipo salvaje de toxina Shiga a Subunidad. Debido a que el motivo de la escisión por furina se compone de residuos de ácido de aproximadamente 20 aminoácidos, en teoría, las mutaciones, delecciones, o inserciones que implican una o más de cualquiera de estas 20 posiciones pueden resultar en una reducción de la sensibilidad de escisión por furina (Tian S et al ., Sci Rep 2: 261 (2012)). La interrupción puede o no puede aumentar la resistencia a otras proteasas.

Ejemplos de tipos de mutaciones que pueden alterar un sitio de escisión por furina y el motivo de escisión por furina son amino delecciones de residuos, inserciones, inversiones, y/o sustituciones, incluyendo las sustituciones con aminoácidos no estándar y/o aminoácidos no naturales. Además, los sitios de escisión por furina y motivos escisión por furina se pueden romper mediante mutaciones que comprenden la modificación de un aminoácido por la adición de una estructura química unido covalentemente que enmascara al menos un aminoácido en el sitio o motivo, ver, por ejemplo, PEGilación (véase Zhang C et al, BioDrugs 26:.. adyuvantes 209-15 (2012) y de moléculas pequeñas (flor D, Expert Opin Drug Discov 7: 807-17 (2012)).

La mutación de uno o ambos de los dos residuos de arginina en el sitio mínimo, furina consenso RXXR a alanina

alterará un motivo escisión por furina y prevenir escisión por furina en ese sitio (véase, por ejemplo Duda A et al, J Virol. 78: 13865-70 (2004)). De manera similar, las sustituciones de residuos de aminoácidos de uno o ambos de los residuos de arginina en el mínimo de escisión por furina motivo RXXR a cualquier residuo de aminoácido no conservativa conocida a la voluntad trabajador experto reducen la sensibilidad de escisión por furina del motivo. En particular, amino sustituciones de residuos de ácido de arginina a cualquier residuo de amino ácido no básico que carece de una carga positiva, tal como, por ejemplo, A, G, P, S, T, D, E, Q, N, C, I, L, M, V, F, W, e y, resultará en un motivo de escisión por furina alterado. Además, las deleciones dentro del motivo escisión por furina del sitio de escisión por furina mínima o el núcleo, motivo escisión por furina reducirán la sensibilidad de escisión por furina del motivo escisión por furina.

En ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención, el motivo de escisión por furina alterado comprende una interrupción en términos de existencia, posición, o grupo funcional de uno o ambos de los residuos de aminoácidos consenso P1 y P4, tales como, por ejemplo, la residuos de aminoácidos en las posiciones 1 y 4 de la mínima escisión por furina motivo R/YxxR.

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una interrupción en la separación entre los residuos de aminoácidos consenso P4 y P1 en términos del número de intervenir residuos de aminoácidos de ser distinto de dos, y, por lo tanto, el cambio o bien P4 y/o P1 en una posición diferente y eliminando la P4 y/o P1 designaciones.

Ciertas interrupciones con motivos escisión por furina se indican en el presente documento por referencia a las posiciones de aminoácidos específicos de la toxina Shiga nativo subunidades proporcionadas en el Listado de Secuencias, señalando que de origen natural de la toxina Shiga A subunidades pueden comprender formas precursoras que contienen secuencias de señal de ácidos de aproximadamente 22 aminoácidos en su amino-terminales que se eliminan para producir maduras toxina Shiga a subunidades y son reconocibles para el experto. Además, ciertas interrupciones con motivos escisión por furina que comprenden mutaciones se indican en el presente documento por referencia a aminoácidos específicos (por ejemplo R para un residuo de arginina) nativa presente en posiciones específicas dentro de la toxina Shiga nativa A subunidades (por ejemplo, R251 para el residuo de arginina en la posición 251 de la amino terminal), seguido por el aminoácido con el que ese residuo ha sido sustituido en la mutación particular en discusión (por ejemplo R251A representa la sustitución de aminoácidos de alanina por arginina en el residuo de aminoácido 251 desde el extremo amino terminal).

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácidos, en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A Subunidad. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende uno o más residuos de aminoácidos sustituciones dentro del mínimo escisión por furina de sitio R/YxxR, tales como, por ejemplo, para stxA y SLT-1A derivados polipéptidos efectores de la toxina Shiga, la forma nativa posicionado residuo de aminoácido R248 sustituido con cualquier, residuo cargado no positiva de aminoácidos y/o R251 sustituido con cualquier residuo de aminoácido cargado no positiva; y para SLT-2A derivada polipéptidos toxina Shiga efectoras, el Y247 residuo de aminoácido de forma nativa posicionado sustituido con cualquier, residuo cargado no positiva de aminoácidos y/o R250 sustituido con cualquier residuo de aminoácido cargado no positiva. En otras ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterada comprende un sitio, mínimo escisión por furina-un alterado R/YxxR pero en su lugar comprende una región flanqueante alterado, tal como, por ejemplo, sustituciones de residuos de aminoácidos en uno o más residuos de aminoácidos en el motivo de escisión por furina de las regiones flanqueantes de forma nativa en posición, por ejemplo, 241-247 y/o 252-259.

En ciertas realizaciones, la interrupción comprende una deleción, inserción, inversión, y/o mutación de al menos un residuo de aminoácido dentro de la región motivo proteasa. En ciertas realizaciones, un resistente a la escisión por proteasa, toxina Shiga polipéptido efector puede comprender una interrupción de la secuencia de aminoácidos nativa posicionado en 249-251 de la subunidad A de toxina semejante a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o la toxina Shiga (SEQ ID nO: 2), o al 247-250 de la subunidad a de toxina semejante a Shiga 2 (SEQ ID nO: 3) o la posición equivalente en un polipéptido efector de la toxina Shiga conservada polipéptido toxina efector y/o no nativo Shiga secuencia. En ciertas realizaciones adicionales, resistente a la escisión por proteasa, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga comprenden una interrupción que comprende una deleción de al menos un aminoácido dentro de la región motivo proteasa. En ciertas realizaciones adicionales, resistente a la escisión por proteasa, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga comprenden una interrupción que comprende una inserción de al menos un aminoácido dentro de la región motivo proteasa. En ciertas realizaciones adicionales, el resistente a la escisión por proteasa, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga comprenden una interrupción que comprende una inversión de los aminoácidos, en donde al menos un aminoácido invertida es dentro de la región motivo proteasa. En ciertas realizaciones adicionales, el resistente a la escisión por proteasa, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga comprenden una interrupción que comprende una mutación, tal como una sustitución de aminoácido a un aminoácido no estándar o un aminoácido con una cadena lateral modificada químicamente. Ejemplos de sustituciones de un solo aminoácido se proporcionan en los Ejemplos.

En ciertas realizaciones, la proteasa resistente-escisión, los polipéptidos de la toxina efectoras Shiga comprenden una interrupción que comprende una sustitución de aminoácido dentro de una región motivo proteasa, donde en la

sustitución se produce en el aminoácido nativa posicionado seleccionado del grupo que consiste en: 247 de la SEQ ID NO: 3, 248 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, 250 de la SEQ ID NO: 3, 251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o la posición equivalente en una toxina Shiga conservado polipéptido efector y/o secuencia de polipéptido efector toxina Shiga no nativo. En ciertas realizaciones adicionales, la sustitución es cualquier aminoácido no conservativa y la sustitución se produce en el resto de aminoácido de forma nativa posicionado seleccionado del grupo que consiste en: 247 de la SEQ ID NO: 3, 248 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID nO: 2, 250 de la SEQ ID nO: 3, 251 de la SEQ ID nO: 1 o SEQ ID nO: 2, o la posición equivalente en un polipéptido efector de la toxina Shiga conservadas y/o secuencia de polipéptido efector toxina Shiga no nativo. En ciertas realizaciones adicionales, la mutación comprende una sustitución de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: R247A, R248A, R250A R251A, o la posición equivalente en un polipéptido efector de la toxina Shiga conservadas y/o secuencia de polipéptido efector toxina Shiga no nativo.

En ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención, el motivo de escisión por furina alterado comprende la delección de nueve, diez, once, o más de los residuos de aminoácido carboxi terminal dentro del motivo escisión por furina. En estas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado no comprenderá un sitio de escisión por furina o un motivo mínimo de escisión por furina. En otras palabras, ciertas realizaciones carecen de un sitio de escisión por furina en el extremo carboxi de la región del fragmento A1.

En ciertas realizaciones, una molécula de la presente invención comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una mutación en el bucle expuesto a la superficie, sensible a la proteasa, conservado entre las subunidades A de toxina Shiga. Por ejemplo, en stxA y SLT-1A, este bucle sensible a proteasa se posiciona de forma nativa desde la posición 242 a la posición 261, y en SLT-2A, este bucle se posiciona de forma nativa desde la posición 241 a la posición 260. Sobre la base de homología de secuencia de polipéptido, el trabajador experto puede identificar este bucle conservado, sensible a la proteasa en otras subunidades A de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, una molécula de la presente invención comprende un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una mutación en este bucle sensible a proteasa de las subunidades A de toxina Shiga, la mutación que reduce la accesibilidad de la superficie de ciertos residuos de aminoácidos dentro del bucle de tal manera que la sensibilidad de escisión por furina se reduce.

En ciertas realizaciones, una molécula de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, comprende el motivo de escisión por furina alterado que comprende la sustitución de residuos de aminoácidos de uno o ambos de los residuos de arginina en el motivo de consenso del sitio de escisión mínimo con A, G, o H. En determinadas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una delección de la región posicionada de forma nativa en 247-252 en StxA (SEQ ID NO: 2) y SLT-1A (SEQ ID NO: 3), o la región posicionada de forma nativa en 246-251 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3); una delección de la región posicionada de forma nativa en 244-246 en StxA (SEQ ID NO: 2) y SLT-1A (SEQ ID NO: 3), o la región posicionada de forma nativa en 243-245 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3); o una delección de la región posicionada de forma nativa en 253 a 259 en StxA (SEQ ID NO: 2) y SLT-1A (SEQ ID NO: 3), o la región posicionada de forma nativa en 252 a 258 en SLT-2A (SEQ ID NO : 3). Ciertas realizaciones adicionales comprenden el motivo de escisión por furina alterado que comprende una combinación de cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente, cuando sea posible.

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterada comprende un truncamiento carboxi terminal en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A Subunidad, el truncamiento que se traduce en la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos dentro del motivo escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende el truncamiento carboxi terminal que elimina uno o más residuos de aminoácidos dentro del sitio de escisión mínimo Y/RXXR, tales como, por ejemplo, para stxA y SLT-1A derivados polipéptidos efectores de toxina Shiga , truncamientos que terminan en el extremo amino de forma nativa posición ácido residuo 250, 249, 248, 247, 246, 245, 244, 243, 242, 241, 240, o menos; y para SLT-2A derivan los polipéptidos efectores de la toxina Shiga, truncamientos terminando en la forma nativa amino posición residuo de ácido 249, 248, 247, 246, 245, 244, 243, 242, 241, o menos.

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterada comprende la mutación que es un truncamiento parcial, carboxi terminal del motivo de escisión por furina; sin embargo, ciertas moléculas de la presente invención no comprenden el motivo de escisión por furina perturbado que es un truncamiento completa, carboxi terminal de la totalidad de residuo de ácido 20 amino, motivo escisión por furina. Por ejemplo, cierto, citotóxicos, moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden un polipéptido toxina efector Shiga que comprende el motivo de escisión por furina alterado que comprende un truncamiento parcial, carboxi terminal de la región del fragmento A1 hasta la posición nativa 240 en stxA (SEQ ID nO: 2) o SLT-1A (SEQ ID nO: 1), pero no un truncamiento carboxi terminal en la posición 239 o menos. Del mismo modo, cierto, citotóxicos, moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden un polipéptido toxina efector Shiga que comprende el motivo de escisión por furina alterado que comprende un truncamiento parcial, carboxi terminal de la región del fragmento A1 hasta la posición nativa 239 en SLT-2A (SEQ ID nO: 3), pero no un truncamiento carboxi terminal en la posición 238 o menos. En las grandes mutaciones de truncamiento carboxi terminales que comprenden el motivo de la escisión de furina alterado, las posiciones P14 y P13 del motivo de escisión por furina todavía están presentes.

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una sustitución de residuo de aminoácido dentro del motivo de escisión por furina y un truncamiento carboxi terminal en comparación con un tipo salvaje, toxina Shiga A de subunidades. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una sustitución de residuo de aminoácido dentro del sitio mínimo de escisión por furina R/YxxR y un truncamiento carboxi terminal en comparación con un tipo salvaje, toxina Shiga A de la subunidad, tal como, por ejemplo, para stxA y SLT-1A derivan polipéptidos toxina efectoras Shiga, truncamientos que termina en la posición de residuo de aminoácido nativo 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, o mayor y que comprende el residuo de aminoácido de forma nativa posicionado R248 y/o R251 sustituido con cualquiera, resto de aminoácido cargado no positiva en su caso; y para SLT-2A derivan polipéptidos toxina efectoras Shiga, truncamientos que termina en el extremo amino de forma nativa posición residuo de ácido 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, o mayor y que comprende el Y247 residuo de aminoácido de forma nativa posicionado y/o R250 sustituido con cualquier residuo de aminoácido cargado no positiva en su caso. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga truncada que comprende un motivo de escisión por furina alterado también comprende el motivo de escisión por furina, los residuos de aminoácidos en las posiciones P9, P8, y/o P7 a fin de mantener la citotoxicidad óptima.

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más deleciones de residuos de aminoácidos internos, en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A Subunidad. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más deleciones de residuos de aminoácidos dentro de la mínima escisión por furina de sitio R/YxxR. Por ejemplo, stxA y SLT-1A derivan polipéptidos efectores de toxina Shiga que comprenden deleciones internas de los residuos de aminoácidos nativa posicionado R248 y/o R251, que se puede combinar con deleciones de residuos circundantes, tales como, por ejemplo, 249, 250, 247, 252, etc; y SLT-2A deriva polipéptidos efectores de toxina Shiga que comprende deleciones internas de los residuos de aminoácidos nativa posicionado Y247 y/o R250, que pueden combinarse con supresiones de residuos circundantes, tales como, por ejemplo, 248, 249, 246, 251, etc. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una deleción de cuatro, residuos consecutivos, de aminoácidos que elimina el mínimo escisión por furina de sitio R/YxxR, tal como, por ejemplo, stxA y SLT-1A deriva polipéptidos toxina efectoras Shiga que carecen R248 -R251 y SLT-2A derivan los polipéptidos efectores de la toxina Shiga que carecen de Y247-R250. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende uno o más residuos de aminoácidos deleciones en los residuos de aminoácidos que flanquean el núcleo motivo escisión por furina, tales como, por ejemplo, una deleción de 244-247 y/o 252-255 en SLT-1A o stxA. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una deleción interna de todo el bucle sensible expuesto en la superficie, de la escisión por proteasa en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A subunidad, tal como, por ejemplo, para stxA y SLT-1A deriva polipéptidos toxina Shiga efectoras, una deleción de residuos de aminoácidos nativa posicionado 241-262; y para SLT-2A derivada polipéptidos toxina Shiga efectoras, una deleción de residuos de aminoácidos nativa posicionado 240-261.

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una deleción de residuos de aminoácidos interna dentro del motivo de escisión por furina y un truncamiento carboxi terminal en comparación con subunidades A de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una deleción de residuos de aminoácidos dentro del mínimo sitio de escisión por furina R/Yx-x-R y un truncamiento carboxi terminal en comparación con un tipo salvaje, toxina Shiga A de subunidades. Por ejemplo, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga con un motivo de escisión por furina alterado pueden comprender deleciones de los residuos de aminoácidos nativa posicionado 248-249 y/o 250-251 en un polipéptido stxA o SLT-1A truncada o la los residuos de aminoácidos 247-248 y/o 249-250 en un truncada SLT-2A. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una deleción de cuatro, residuos consecutivos de aminoácidos que elimina el sitio mínimo de escisión por furina R/Y-x-x-R y un truncamiento carboxi terminal en comparación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, para stxA y SLT-1A derivada polipéptidos toxina efectoras Shiga, truncamientos que termina en el extremo amino de forma nativa residuo de ácido posición 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, o mayor y carente R248-R251; y para SLT-2A derivan polipéptidos toxina efectoras Shiga, truncamientos que termina en el extremo amino de forma nativa posición residuo de aminoácido 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, o mayor y carente de Y247-R250.

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una deleción de residuos de aminoácidos y una sustitución de residuo de aminoácido en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A Subunidad. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más deleciones de aminoácidos de residuos y sustituciones dentro del mínimo escisión por furina de sitio R/YxxR, tales como, por ejemplo, para stxA y SLT-1A deriva polipéptidos toxina efectoras Shiga, las residuo de aminoácido de forma nativa posicionado R248 sustituido con cualquier, residuo cargado no positiva de aminoácidos y/o R251

sustituido con cualquier residuo de aminoácido cargado no positiva; y para SLT-2A derivada polipéptidos toxina Shiga efectoras, el residuo de aminoácido Y247 de forma nativa posicionado sustituido con cualquier residuo cargado no positiva de aminoácidos y/o R250 sustituido con cualquier residuo de aminoácido cargado no positiva.

5 En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una delección de residuos de aminoácidos y una sustitución de residuo de aminoácido, así como un truncamiento carboxi terminal en comparación con un tipo salvaje, toxina Shiga A de subunidades. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más delecciones de aminoácidos de residuos y sustituciones dentro del mínimo escisión por furina de sitio R/YxxR, tales como, por ejemplo, para stxA y SLT-1A deriva polipéptidos toxina efectoras Shiga, las residuo de aminoácido de forma nativa posicionado R248 sustituido con cualquier, residuo cargado no positiva de aminoácidos y/o R251 sustituido con cualquier residuo de aminoácido cargado no positiva; y para SLT-2A derivada polipéptidos toxina Shiga efectoras, el Y247 residuo de aminoácido de forma nativa posicionado sustituido con cualquier, residuo cargado no positiva de aminoácidos y/o R250 sustituido con cualquier residuo de aminoácido cargado no positiva.

15 En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una sustitución de aminoácido en el sitio mínimo de escisión por furina R/Y-x-x-R y un truncamiento carboxi terminal en comparación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, polipéptidos efectores de la toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A, truncamientos que terminan en la posición de aminoácido de forma nativa 249, 250, 20 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291 o mayor y que comprende el residuo de aminoácido situado de forma nativa R248 y/o R251 sustituido por cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente cuando sea apropiado; y para polipéptidos efectores de la toxina Shiga derivados de SLT-2A derivan polipéptidos toxina efectoras Shiga, los truncamientos que terminan en la posición de aminoácido de forma nativa 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, o mayor y que comprende el residuo de aminoácido situado de forma nativa Y247 y/o R250 sustituido por cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente.

30 En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una inserción de uno o más residuos de aminoácidos en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A Subunidad siempre que el residuo (s) amino insertado no crea una de novo furin- sitio de escisión. En ciertas realizaciones, la inserción de uno o más residuos de aminoácidos altera la separación natural entre los residuos de arginina en el sitio mínimo, escisión por furina R/YxxR, tal como, por ejemplo, stxA y SLT-1A polipéptidos derivados que comprende una inserción de uno o más 35 residuos de aminoácidos en 249 o 250 y por lo tanto entre R248 y R251; o SLT-2A deriva polipéptidos que comprenden una inserción de uno o más residuos de aminoácidos en 248 o 249 y por lo tanto entre Y247 y R250.

En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una inserción de restos de aminoácidos y un truncamiento carboxi terminal en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A Subunidad. En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una inserción de restos de aminoácidos y una sustitución de residuo de aminoácido en comparación con una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una inserción de restos de aminoácidos y una delección de residuos de aminoácidos en comparación con un subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje.

45 En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una delección del residuo de aminoácido, una inserción de residuos de aminoácidos, y una sustitución de residuo de aminoácido en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A Subunidad.

50 En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una delección del residuo de aminoácido, inserción, sustitución, y el truncamiento carboxi terminal en comparación con un tipo salvaje, la toxina Shiga A Subunidad.

En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado se fusiona directamente por un enlace peptídico a un resto molecular que comprende un aminoácido, péptido, y/o polipéptido en el que la estructura de fundido implica un único polipéptido, continua. En estas realizaciones de fusión, la secuencia de aminoácidos siguiente el motivo escisión por furina alterado no debe crear una, sitio de escisión por furina de novo en la unión de fusión.

60 Las subunidades A de la toxina Shiga A podría tener otros motivos escisión por furina además el motivo de la escisión por furina en la, estructura de bucle expuesto en la superficie altamente conservada y nativa posicionado en la región de L238to F257 en stxA y SLT-1A y de V237 a Q256 en SLT- 2A. Por ejemplo, stxA y SLT-1A comprenden un motivo de escisión por furina alrededor de la región de residuos de aminoácidos nativa posicionado 220 a 223. Sin embargo, no hay evidencia de este segundo sitio de furina en toxina Shiga A Subunidades se escinde *in vivo*. Por el contrario, el tratamiento *in vitro* de holotoxina Stx2 con furina humana no produjo la escisión en cualquier otro motivo RXXR en la subunidad A (por ejemplo, el motivo de forma nativa posicionado desde el residuo de 65

aminoácido 179 a 222) al lado de en Arg250, lo que sugiere que otros díbasico potencial sitios dentro de la toxina Shiga a Subunidades no son accesibles a furina (Faqerquist C, Sultan O, J Biomed Biotechnol 2010: 123460 (2010)). Aunque la interrupción de otros sitios de escisión además podría ser diseñado, por ejemplo, el motivo de escisión por furina en L238to F257 en StxA1 y SLT-1A, lo que altera el motivo de escisión por furina de forma nativa posicionada en la región de 220 a 223 en SLT-1A puede reducir su citotóxico la actividad de una actividad razonable (véase, por ejemplo Lea N et al, Microbiología 145: 999 a 1.004 (1999)) y proporcionaría poco beneficio relacionado con la proteasa-resistencia si el sitio de la proteasa en la región de 220 a 223 no se proteasa accesible.

#### B. Restos moleculares situados carboxi terminal al polipéptido efector de la toxina Shiga

Las moléculas dirigidas a células de la presente invención, citotóxicas, comprenden un resto molecular asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención permite la unión de restos moleculares relativamente grandes carboxi terminal a los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por furina sin ninguna pérdida en la citotoxicidad efectora de la toxina Shiga en comparación con polipéptidos efectores de la toxina Shiga escindibles por furina. El término "resto molecular" abarca polipéptidos, proteínas, agentes citotóxicos, polinucleótidos, agentes de promoción de la detección, agentes quimioterapéuticos de molécula pequeña, polisacáridos, lípidos y otras biomoléculas de origen natural o sintético.

La proteólisis por furina de la subunidad A de la toxina Shiga dentro de una célula intoxicada proporciona al menos tres eventos: exposición del extremo carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga, liberación del fragmento A1 de todas los otros restos moleculares y la translocación del fragmento A1 del retículo endoplásmico al citosol. Se requiere que la disociación del fragmento A1 del fragmento A2 y del resto de la holotoxina Shiga para la translocación del fragmento A1 desde el lumen del retículo endoplásmico al citosol y el único componente de la holotoxina Shiga que llega al compartimiento citosólico es el fragmento A1 (LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Tam P, Lingwood C, Microbiology 153: 2700-10 (2007); Li S et al, PLoS One 7: e41119 (2012)).

Una función crítica de la escisión por furina durante la intoxicación por toxina Shiga parece ser la exposición del extremo carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga. La exposición del extremo carboxi terminal del fragmento A1 en el retículo endoplasmático de una célula intoxicada se piensa que es necesaria para el direccionamiento subcelular óptimo y la citotoxicidad. Cuando una toxina Shiga. Cuando no se puede exponer una estructura derivada de la subunidad A de toxina Shiga al extremo carboxi terminal de un fragmento A1 en el retículo endoplasmático de una célula intoxicada, entonces se reduce el efecto citotóxico de esa estructura (Burgess B, Roberts L, Mol Microbiol 10: 171-9 (1993); Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144- 9 (2007)). Esto puede explicarse por la persistencia de uno o más restos moleculares que cubren estéricamente el extremo carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga que da lugar a la perturbación del dirccionamiento intracelular normalmente eficiente del fragmento A1 al citosol. Las estructuras derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga que carecen de procesamiento proteolítico por furina no logran alcanzar de manera eficiente el citosol de las células intoxicadas (Garred Ø et al, J Biol Chem 270: 10817-21 (1995); Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Lea N et al, Microbiology 145: 999-1004 (1999)).

Otra función crítica de escisión de furina durante Shiga intoxicación por la toxina es la liberación del fragmento A1 toxina Shiga del resto de la holotoxina Shiga. Liberación del fragmento A1 en el retículo endoplasmático de una célula intoxicada se piensa que es necesario para el direccionamiento subcelular óptima y la citotoxicidad. Cuando un fragmento de la toxina Shiga A1 no puede ser furina escinde y liberada en el retículo endoplasmático de una célula intoxicado, a continuación, el efecto citotóxico se reduce (Burgess B, Roberts L, Mol Microbiol 10: 171-9 (1993); Garred Ø et al ., Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); magra et al, Microbiología 145: 999 a 1.004 (1999); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357:.. 144-9 (2007)). Una vez más, esto puede ser explicado por la persistencia de uno o más restos moleculares asociados con el extremo carboxi terminal del fragmento A1 toxina Shiga que resulta en la perturbación de la hoja de ruta intracelular normalmente eficiente del fragmento A1 al citosol.

Para máxima citotoxicidad de la toxina Shiga, modelos sugieren que es esencial que el fragmento de toxina Shiga A1 se libera de todos los restos moleculares asociados con y/o cubrir estéricamente su extremo carboxi terminal para el direccionamiento citosólica eficiente, la evasión proteasoma óptima, formación de la estructura catalítica óptima, y activación enzimática máxima (Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, J Biol Chem. 270: 10817-21 (1995); magra et al, Microbiología 145: 999- 1004 (1999); LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Yu M, Haslam D, Infect Immun 73: 2524-32 (2005); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun. 357: 144-9 (2007); Smith M et al, Infect Immun 77: 2730-40 (2009); Di R et al, Toxicon 57:... 525-39 (2011); Li S et al, PLoS One 7: e41119 (2012)). Por ejemplo, el fragmento de toxina A2 Shiga se fusiona al fragmento A1 de tipo salvaje, holotoxinas Shiga y el pentámero de la toxina Shiga subunidades B está unido al extremo carboxi terminal del fragmento A2 (Fraser M et al., Nat Struct Biol 1: 59-64 (1994)). Del mismo modo, maximal toxina Shiga citotoxicidad podría requerir la liberación del fragmento A1 de todas las fracciones moleculares asociados con su extremo carboxilo terminal, tales como, por ejemplo, restos de al menos tan grande como el fragmento A2 (4.5 a 4.7 kDa) y de la masa de la resto de la holotoxina Shiga (42,7-43,2 kDa).

En relación con esto, la citotoxicidad máxima de la toxina Shiga podría requerir la liberación del fragmento A1 de todos los restos carboxi terminal que cubren estéricamente el extremo carboxi terminal del fragmento A1 ya que esta región debe estar expuesta para la translocación eficiente al citosol (véase Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998); LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Yu M, Haslam D, Infect Immun., 73: 2524-32 (2005); Li S et al, PLoS One. 7: e41119 (2012)).

Además, para la máxima citotoxicidad de la toxina Shiga podría ser importante liberar el fragmento A1 de restos moleculares que comprenden dominios de unión dirigidos a células que se unen a componentes de la membrana celular, tales como subunidades B de la toxina Shiga que se unen a gangliósidos en membranas de bicapa lipídica. Es posible que cuando el fragmento A1 se une covalentemente a un resto dirigido a las células unida con alta afinidad a una membrana endoplásmica diana, entonces el fragmento A1 de la toxina de Shiga permanece unido a la membrana lipídica del retículo endoplasmático de una manera que perturba mecanismos y eventos requeridos para una eficiente liberación del fragmento A1 y/o la translocación al citosol.

La presente invención proporciona estructuras a modo de ejemplo que demuestran que no se requieren las funciones de la escisión por furina de toxina Shiga A subunidades en los modelos descritos anteriormente para los niveles de tipo salvaje de Shiga citotoxicidad mostrada por moléculas dirigidas a células sintéticas (véase Ejemplos, infra). Al parecer, el extremo carboxi terminal del fragmento de la toxina A1 de Shiga no necesita ser expuesta para el enrutamiento intracelular eficiente para el citosol, y, al parecer, no se requiere la liberación del fragmento A1 de todas las otras fracciones moleculares para máxima, toxina Shiga citotoxicidad. Por lo tanto, el motivo de escisión por furina de la toxina Shiga subunidades puede ser alterado en moléculas dirigidas a células sin sacrificar ninguna citotoxicidad a pesar de la presencia de un resto molecular situado con la molécula carboxi terminal dirigido a las células a la región polipéptido toxina Shiga efector.

Las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención comprenden un resto molecular asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector toxina Shiga, como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones adicionales, la asociación comprende un enlace covalente que une el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, ya sea directa o indirectamente, con el resto molecular. En ciertas realizaciones adicionales, la asociación comprende el enlace peptídico que se fusiona el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga con uno o más residuos de aminoácidos de el resto molecular. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de la toxina Shiga y el resto molecular se fusionan para formar un único polipéptido, continua tal que el polipéptido efector de la toxina Shiga está situado físicamente dentro de la amino-terminal al resto molecular polipéptido continuo.

En la molécula dirigida a células citotóxica de la presente invención, el resto molecular tiene una masa de al menos 1,5 kDa. El tamaño del resto molecular puede variar. Los restos moleculares de las moléculas de la presente invención incluyen: restos suficientemente grandes para cubrir estéricamente el extremo carboxi terminal de un fragmento A1 de la toxina Shiga, los restos de cualquier tamaño que comprenden regiones de unión capaces de unirse a dianas unidas a membrana lipídica, restos de cualquier tamaño que proporcionan una estructura terciaria de polipéptido bien estructurada proximal a la región carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga de la invención, los restos de cualquier tamaño que son más polares e hidrófilos que el extremo carboxi terminal de los fragmentos A1 de la toxina Shiga, y cualquier resto igual o mayor que el tamaño de una subunidad A de la toxina Shiga nativa (aproximadamente 28 kDa). Un resto molecular de un tamaño igual o mayor que 28 kDa se denomina aquí como "relativamente grande".

En ciertas realizaciones, una molécula de la invención puede comprender al resto molecular que comprende un péptido. Una molécula de la invención comprende un resto amolecular que tiene una masa de 1,5 kDa o mayor. En ciertas realizaciones, una molécula de la invención puede comprender al resto molecular que tiene una masa de al menos 4,5 kDa, 6, kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o mayor, siempre que la molécula conserve la actividad biológica de la toxina Shiga apropiada señalada en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el resto molecular tiene una masa de aproximadamente 4,5 kDa u otra masa equivalente de un fragmento A2 de la toxina Shiga. Fue inesperado que un resto de este tamaño puede permanecer unido al extremo carboxi del fragmento A1 de la toxina Shiga sin alterar la eficiencia de direccionamiento subcelular y la inactivación de ribosomas dentro de las células intoxicadas.

En ciertas realizaciones, el resto molecular tiene una masa de aproximadamente 7,6 kDa u otra masa equivalente de una subunidad B de toxina Shiga. Fue inesperado que un resto de este tamaño pudiera permanecer unida al extremo carboxi del fragmento A1 de la toxina Shiga sin alterar la eficiencia del direccionamiento subcelular y la inactivación de ribosomas dentro de las células intoxicadas.

En ciertas realizaciones, el resto molecular tiene una masa de aproximadamente 6-10 kDa o mayor y comprende una región de unión que comprende un mimético de anticuerpo o formato alternativo de anticuerpo, tal como, por ejemplo, polipéptidos repetidos del armadillo modificados (ArmRPs), dominio de la 10<sup>a</sup> fibronectina de tipo III (10Fn3) derivado de fibronectina modificado (monocuerpos, AdNectins™ o AdNexins™); polipéptido que contiene motivo de

repetición de anquirina modificado (DARPin<sup>TM</sup>); dominio A derivado del receptor de lipoproteína de baja densidad modificado (LDLR-A) (Avimers<sup>TM</sup>); dominio Z derivado de proteína A modificado (Affibodies<sup>TM</sup>); andamio derivado gamma-B cristalina modificado o andamio derivado de ubiquitina modificado (Affilins); y polipéptidos derivados de Sac7d (Nanofitins<sup>®</sup> o afitinas).

5 En ciertas realizaciones, el resto molecular tiene una masa de aproximadamente 11 kDa o más, y comprende una región de unión que comprende un dominio o dominios de inmunoglobulina y que se une específicamente a una biomolécula diana extracelular con alta afinidad, tal como, por ejemplo, una V<sub>HH</sub> o nanoanticuerpo. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular tiene una masa de aproximadamente 24 kDa o más, y comprende una  
10 región de unión que comprende un dominio de inmunoglobulina y que se une específicamente a una biomolécula diana extracelular con alta afinidad, tal como, por ejemplo, un scFv.

15 En ciertas realizaciones, el resto molecular tiene una masa de aproximadamente 12 kDa o de otra masa equivalente de un complejo de fragmento A2 y subunidad B de la toxina Shiga. Fue inesperado que un resto de este tamaño pudiera permanecer unido al extremo carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga sin alterar la eficiencia de direccionamiento sub-celular y la inactivación de ribosomas dentro de las células intoxicadas.

20 En ciertas realizaciones, el resto molecular tiene una masa de aproximadamente 28 kDa. Fue inesperado que un resto de este tamaño pueda permanecer unido al extremo carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga sin alterar la eficiencia de direccionamiento subcelular y la inactivación de ribosomas dentro de las células intoxicadas; sin embargo, los ejemplos de esta memoria demuestran que una molécula resistente a la escisión por furina que comprende un fragmento A1 de la toxina Shiga fusionado a un resto molecular de 28 kDa no exhibió ninguna alteración aparente en el direccionamiento subcelular, la inhibición de ribosomas, o la citotoxicidad.

25 En ciertas realizaciones, el resto molecular relativamente grande tiene una masa de aproximadamente 39 kDa o otra masa equivalente de un pentámero de subunidades B de la toxina Shiga. Fue inesperado que un resto de este tamaño pudiera permanecer unido al extremo carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga sin alterar la eficiencia de direccionamiento subcelular y la inactivación de ribosomas dentro de las células intoxicadas.

30 En ciertas realizaciones, el resto relativamente grande, molecular tiene una masa de aproximadamente 43,2 kDa u otra masa equivalente de un fragmento A2 de la toxina Shiga y complejo pentámero de la subunidad B. Fue inesperado que un resto de este tamaño pueda permanecer unido al extremo carboxi terminal del fragmento A1 de la toxina Shiga sin alterar la eficiencia de direccionamiento subcelular y la inactivación de ribosomas dentro de las  
35 células intoxicadas.

En ciertas realizaciones, el resto molecular está ramificado. En ciertas realizaciones, el resto de molécula no es proteínico. En ciertas realizaciones, el resto molecular es un agente citotóxico o agente inductor de la detección, tales como los agentes descritos en este documento.

40 En ciertas realizacones, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi terminal del polipéptido del fragmento A1 de la toxina Shiga del polipéptido efector de la toxina Shiga de la invención. Para los propósitos de la presente invención, "cubrir estéricamente" o "que cubre estéricamente" se refiere a un resto unido covalentemente directamente a la región carboxi terminal del polipéptido fragmento del fragmento A1 de la toxina Shiga del polipéptido efector de la toxina Shiga de la invención. En ciertas realizaciones, el resto molecular cubre  
45 estéricamente la región carboxi terminal del polipéptido de fragmento A1 de la toxina Shiga del polipéptido efector de la toxina Shiga de la invención, de tal manera que la región hidrófoba dentro de la región carboxi terminal del polipéptido del fragmento A1 de la toxina Shiga A1 del polipéptido efector de la toxina Shiga de la invención permanecerá escondida y no está expuesta en la superficie en el retículo endoplásmico, manteniendo de este modo el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 cubierta y evitando el reconocimiento celular del extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1, tales como, por ejemplo, reconocimiento por la maquinaria ERAD.  
50

55 En ciertas realizaciones, el resto molecular comprende un polipéptido que es más polar e hidrófilo que la región carboxi terminal de un fragmento A1 de la toxina Shiga de tal manera que la región hidrófoba dentro de la región carboxi terminal del polipéptido del fragmento A1 de la toxina Shiga A1 del polipéptido efector de la toxina Shiga de la invención permanecerá escondida y no está expuesta en la superficie en el retículo endoplásmico, manteniendo de este modo el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 cubierto y evitando el reconocimiento celular del extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1, tal como, por ejemplo, el reconocimiento por parte la maquinaria ERAD.  
60

En ciertas realizaciones, el resto molecular comprende una región de unión capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana que está unida a la membrana en la membrana del retículo endoplásmico.

65 En ciertas realizaciones, el resto molecular comprende una región de unión capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular.

C. Moléculas que se dirigen a moléculas que comprenden polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa de la invención

5 Las moléculas de la presente invención comprenden todas un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado (y opcionalmente un sitio de escisión por furina alterado), tal como se define en las reivindicaciones. Las moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa asociado con una región de unión dirigida a células, tal como se define en las reivindicaciones. Esto significa que la molécula dirigida a células es más resistente a la escisión por proteasa en comparación con la misma molécula dirigida a células que tiene su polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por furina reemplazado por un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje que comprende un fragmento A1 de la toxina Shiga.

15 Las moléculas resistentes a la escisión por proteasa pueden exhibir vidas medias aumentadas, *in vivo*, después de la administración a un vertebrado en comparación con más variantes sensibles a escisión por proteasa. Además, las moléculas dirigidas a células resistentes a la escisión por proteasa comprenden un componente tóxico (por ejemplo, una región efectora de toxina) pueden exhibir toxicidad no específica reducida en comparación con variantes más sensibles a la escisión por proteasa con una mayor propensión a romperse, liberando de ese modo el componente tóxico.

20 Las moléculas dirigidas a células de la presente invención pueden comprender un único polipéptido, múltiples polipéptidos en asociación unos con otros, un componente de polipéptido ramificado, y/o uno o más restos no polipeptídicos.

25 La región de unión de una molécula dirigida a células de la invención comprende una región de péptido o polipéptido capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular. En ciertas realizaciones, la región de unión de una molécula dirigida a células de la invención comprende uno o más polipéptidos capaces de manera selectiva y específica de unirse a una biomolécula diana extracelular. La región de unión puede comprender uno o más restos peptídicos o polipéptidos diversos, tales como secuencias de péptidos generados de forma aleatoria, ligandos de origen natural o derivados de los mismos, dominios derivados de inmunoglobulina, andamios estructurales modificados sintéticamente como alternativas a dominios de inmunoglobulina y similares.

30 Hay numerosas regiones de unión conocidos en la técnica que son útiles para el direccionamiento de polipéptidos a tipos de células específicas a través de sus características de unión, tales como ligandos, anticuerpos monoclonales, derivados de anticuerpos modificados, y alternativas modificadas a los anticuerpos.

35 Según un aspecto específico, pero no limitativo, la región de unión de la molécula de la invención comprende un ligando natural o derivado del mismo que conserva la funcionalidad de unión a un biomolécula diana extracelular, comúnmente un receptor de superficie celular. Por ejemplo, se pueden utilizar diversas citocinas, factores de crecimiento y hormonas conocidos en la técnica para dirigir la molécula dirigida a células a la superficie celular de tipos de células específicas que expresan un receptor de citoquinas afín, receptor de factor de crecimiento o receptor de hormona. Ciertos ejemplos no limitativos de ligandos incluyen factores de crecimiento epidérmico, factores de crecimiento de fibroblastos, factores de crecimiento endoteliales vasculares, interleucinas (tales como IL-2, IL-6, y IL-23), y factores activadores de células B (BAFF).

40 Según 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)).

45 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 aquí, 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 ser funcionalmente definidas 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.

50 Las proteínas inmunoglobulina (Ig) tienen un dominio estructural conocido como un dominio de Ig. Los dominios Ig varían en longitud desde alrededor de 70-110 residuos de aminoácidos y poseen una característica Ig veces, en la que típicamente de 7 a 9 hebras beta antiparalelas ordenar en dos láminas beta, que forman una estructura tipo sándwich. El pliegue Ig se estabiliza mediante interacciones de aminoácidos hidrófobos en las superficies interiores de la sándwich y altamente conservada de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína en las hebras. Los dominios de Ig pueden ser variables (IGV o V-set), constante (IgC o C-set) o intermedio (GII o I-set). Algunos dominios de Ig pueden estar asociados con una región determinante de complementariedad o región determinante de complementariedad (CDR) que es importante para la especificidad de anticuerpos de unión a sus epítipos. 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.

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 del mismo 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 "estructural" ("frame") interrumpida por las tres CDRs o ABRs. Las regiones estructurales sirven para alinear las CDR para la unión específica a un epítipo de un antígeno. Desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo, ambos dominios  $V_H$  y  $V_L$  comprenden las siguientes regiones estructurales (FR) y CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Para fragmentos  $V_HH$  de camélidos, IgNARs de peces cartilagosos, 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.

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 similar a Ig de una proteína no inmunoglobulina, por ejemplo, mediante ingeniería molecular o la selección por cribado de la biblioteca. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante y el cribado de biblioteca *in vitro* en la generación de regiones de unión de tipo inmunoglobulina, pueden rediseñarse anticuerpos para obtener las características deseadas, tales como el tamaño más pequeño, entrada en la célula, o de 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 las, moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención. Una región de unión a inmunoglobulina generalmente comprende una o más CDR. En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina se 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 modificado no derivado de cualquier dominio de inmunoglobulina, pero que funciona como una región de unión la inmunoglobulina al proporcionar una unión muy específica a una biomolécula diana extracelular. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente andamios estructurales de polipéptido que comprenden o que consisten esencialmente en las regiones determinantes de 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 direccionamiento 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 de anticuerpo de un solo dominio (sdAbs), nanocuerpos, dominios de anticuerpo de cadena pesada derivados de camélidos (fragmentos  $V_H$  H), nanoanticuerpos bivalentes, dominios de anticuerpos de cadena pesada derivados de peces cartilagosos, nuevos receptores de antígeno de inmunoglobulina (IgNARs), fragmentos  $V_{NAR}$ , fragmentos variables de cadena única (scFv), fragmentos scFv multimerizantes (diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos), fragmentos scFv en tándem biespecífico, estabilizado con disulfuro variable de anticuerpo (Fv fragmentos), fragmentos de unión a antígeno (Fab) estabilizados con disulfuro que consisten en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_H1$ , fragmentos divalentes  $F(ab')_2$ , fragmentos Fd que consisten en la cadena pesada y dominios  $C_H1$ , minicuerpos Fv- $C_H3$  de cadena única, minicuerpos biespecíficos, fragmentos de dominio  $C_H2$  diméricos ( $C_H2D$ ), dominios de unión a antígeno Fc (Fcabs), fragmentos aislados de la región determinante de complementariedad 3 (CDR3), polipéptidos de región estructural 3 limitada, CDR3, región estructural 4 (FR3-CDR3-FR4), dominios inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y cualquier homólogo genéticamente manipulado de los anteriores que retenga su paratopo y función de unión (véase, Weiner L, Cell 148: 1081-4 (2012); . Ahmad Z et al, Clin Immunol 2012 Dev: 980.250 (2012), para una revisión).

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la región de unión incluye andamios estructurales alternativos diseñados para dominios de inmunoglobulina que exhiben características funcionales similares, tales como unión de alta afinidad y específica de biomoléculas diana, y permite la ingeniería de características mejoradas, tales como una mayor estabilidad o inmunogenicidad reducida. 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<sup>o</sup> 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 (Nanoffitins® o affitinas); 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)); Alfaraño P et al, Protein Sci. 21: 1298-314 (2012); Madhurantakam C et al, Protein Sci 21: 1015-1028 (2012); Varadamsetty G et al, J Mol Biol 424: 68-87 (2012)).

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de un nanoanticuerpo o de una región derivada de inmunoglobulina de dominio único  $V_{HH}$ . Generalmente, los nanoanticuerpos se construyen a partir de fragmentos de anticuerpos individuales, monoméricos de dominio variable de origen natural (sdAbs) del tipo que se encuentra en camélidos y peces cartilaginosos (Chondrichthyes). Los nanoanticuerpos se modifican a partir de estos anticuerpos de origen natural truncando el dominio variable monomérico individual para crear moléculas más pequeñas y más estables, tales como, por ejemplo, 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.

Cualquiera de las regiones de unión anteriores se puede utilizar como un componente de las moléculas dirigidas a células de la presente invención siempre que el componente de región de unión tenga una constante de disociación de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro, preferiblemente menor que 200 nanomolar (nM), hacia una biomolécula diana extracelular.

El direccionamiento específico de células se puede lograr uniendo moléculas de la presente invención a portadores dirigidos a células, tales como, por ejemplo, liposomas, polímeros, nanotransportadores, microesferas, nanoesferas, dendrímeros, micelas poliméricas, materiales de silicio o de carbono, tales como por ejemplo, nanotubos, nanovaras y nanocuernos, nanopartículas magnéticas, microemulsiones, y otras nanoestructuras (Sinha R et al, Molecular Cancer Therapeutics 5: 1909-1917 (2006); L Brinton et al, Diario del Instituto Nacional del cáncer 100: 1643-8 (2008); Tanaka T et al, Biomed Micro Devices 11: 49-63 (2009)). La unión puede llevarse a cabo usando enlaces covalentes y/o encapsulación.

### 30 Biomoléculas diana extracelulares

La región de unión de la molécula de la invención comprende una región de polipéptido 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 epitopos, 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 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 moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden dominios de unión capaces de unir dianas de la superficie celular que

son expresadas exclusivamente por un solo tipo de células a la superficie celular. Esto permite que la eliminación de células selectivas de tipos de células específicas con una alta preferencialidad (al menos 3 veces un efecto citotóxico) sobre tipos de células "observadoras" que no expresan la biomolécula diana extracelular. 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 extracelular se expresa en cantidades suficientemente bajas y/o se acoplan físicamente en cantidades bajas con tipos de células que no son reconocidas. Esto también permite la eliminación de células selectivas de tipos de células específicas con una alta preferencialidad (al menos 3 veces un efecto citotóxico) sobre tipos de células "observadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana extracelular o no se acoplan físicamente a cantidades significativas de la biomolécula diana extracelular. Una célula diana puede eliminarse utilizando las moléculas dirigidas a células, citotóxicas, de la invención bajo condiciones variadas de la célula, tales como cultivos *ex vivo*, *in vitro*, o incluyendo *in vivo* las células *in situ* en sus ubicaciones nativas dentro de un organismo multicelular.

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.

La estructura general de las moléculas dirigidas a células de la presente invención es modular en que varias regiones de unión diversas se pueden utilizar con el mismo polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa para proporcionar un direccionamiento diverso de varias biomoléculas diana extracelulares y por lo tanto el direccionamiento de la citotoxicidad, la citostasis y/o liberación de material exógeno a varios tipos de células diversas. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa que no son citotóxicos todavía pueden ser útiles para liberar materiales exógenos en las células, ciertos compartimentos subcelulares y/o proporcionar direccionamiento subcelular eficiente al citosol. Opcionalmente, una molécula dirigida a células de la invención puede comprender además un motivo señal de retención/recuperación endoplasmático carboxi terminal, tal como KDEL.

#### D. Motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplasmático de un miembro de la familia KDEL

Para los propósitos de la presente invención, la frase "motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplasmático", motivo señal de tipo KDEL (SEQ ID NO: 62) o motivo señal se refiere a cualquier miembro de la familia KDEL ('KDEL' descrita como SEQ ID NO: 62) capaz de funcionar dentro de una célula eucariota para promover la localización subcelular de una proteína al retículo endoplasmático a través de receptores KDEL ('KDEL' descrita como SEQ ID NO: 62).

La secuencia carboxi terminal lisina-asparagina-glutamato-leucina (KDEL (SEQ ID NO: 62)) es un motivo canónico de retención en el retículo endoplasmático y señal de recuperación para las proteínas solubles en células eucariotas y es reconocido por los receptores de KDEL ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62) (véase, Capitani M, Salles M, FEBS Lett 583: 3863-71 (2009), para revisión). La familia KDEL ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62) de los motivos de señal incluye muchos motivos similar a KDEL ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62), tal como HDEL (SEQ ID NO: 64), RDEL (SEQ ID NO: 66), WDEL (SEQ ID NO: 67), YDEL (SEQ ID NO: 68), HEEL (SEQ ID NO: 70), KEEL (SEQ ID NO: 71), REEL (SEQ ID NO: 72), KFEL (SEQ ID NO: 75), KIEL (SEQ ID NO: 87), DKEL (SEQ ID NO: 88), KKEL (SEQ ID NO: 91), HNEL (SEQ ID NO: 95), HTEL (SEQ ID NO: 96), KTEL (SEQ ID NO: 97), y HVEL (SEQ ID NO: 98), 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 ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62) incluye al menos 46 variantes de polipéptidos mostradas usando construcciones sintéticas (Raykhel, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007)). Los motivos señal de KDEL (SEQ ID NO: 62) adicionales incluyen ALEDEL (SEQ ID NO: 109), HAEDEL (SEQ ID NO: 110), HLEDEL (SEQ ID NO: 111), KLEDEL (SEQ ID NO: 112), IRSDEL (SEQ ID NO: 113), ERSTEL (SEQ ID NO: 114), y RPSTEL (SEQ ID NO: 115) (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 (SEQ ID NO: 62) se ha descrito como [KRHQSA]-[DENQ]-E-L (SEQ ID NO: 116) (Hulo N et al, Nucleic Acids Res 34: D227-30 (2006)).

Las proteínas que contienen motivos señal de la familia KDEL ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62) están unidas por los receptores KDEL ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62) 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 ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62) 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 ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62) 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 ('KDEL' divulgado como SEQ ID NO: 62). En otras palabras, algunos miembros de la familia KDEL ('KDEL' divulgado como SEQ ID

NO: 62) 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).

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

10 A los efectos de las moléculas dirigidas a células de la presente invención, el orden o la orientación específica no es fijo para el polipéptido efector de la toxina Shiga y la región de unión que reconoce la célula en relación el uno al otro o del extremo y extremo u extremos N o C-terminales de toda la proteína (véase por ejemplo la Figura 1). En las moléculas dirigidas a células de la invención, las regiones de unión, las regiones de polipéptido efector de la toxina Shiga, y si está presente, cualquier resto molecular, puede unirse directamente el uno al otro y/o unirse adecuadamente entre sí mediante uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica.

15

#### E. Uniones que conectan componentes de las moléculas de la invención

20 Los restos moleculares individuales y componentes de polipéptido y/o proteína de las moléculas dirigidas a célula citotóxicas de la invención, por ejemplo, las regiones de unión y regiones del polipéptido efector de toxina Shiga (que pueden ser citotóxicos y/o albergar una o más mutaciones alterando, reduciendo o eliminando la actividad catalítica y/o citotoxicidad), pueden unirse adecuadamente entre sí mediante uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento. Los subcomponentes de polipéptidos individuales de las regiones de unión, por ejemplo, CDR, ABR, regiones  $V_{HH}$ , regiones variables de cadena pesada ( $V_H$ ), regiones variables de cadena ligera ( $V_L$ ), regiones IgNAR, y/o regiones  $V_{NAR}$ , pueden unirse convenientemente entre sí a través de uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento (véase, por ejemplo Weisser N, Hall J, Biotechnol Adv 27: 502-20 (2009); Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65.: 1357-1369 (2013)). Los componentes proteicos y de polipéptidos de las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la invención, por ejemplo, regiones de unión multi-cadena, pueden unirse adecuadamente entre sí, a otros componentes de polipéptidos, y/o fracciones moleculares mediante uno o más enlazadores conocidos en la técnica. Los componentes peptídicos, por ejemplo, motivos de señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático de la familia KDEL ('KDEL' descrito como SEQ ID NO: 62), pueden unirse adecuadamente a otro componente mediante uno o más enlazadores, tales como un enlazador proteínico, que son bien conocidos en la técnica.

25

30

35 Los enlazadores adecuados son generalmente aquellos que permiten que cada componente de polipéptido de las moléculas dirigidas a células citotóxicas se plieguen en 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 proteínicas, ya sean ramificadas o cíclicas (véase, por ejemplo Alley S et al, Bioconjug Chem. 19: 759-65 (2008)); Ducry L, Stump B, Bioconjug Chem 21: 5-13 (2010); Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)).

40

45 Los enlazadores adecuados pueden ser proteínico y comprender uno o más aminoácidos, péptidos y/o polipéptidos. Los enlazadores proteicos son adecuados para ambas proteínas de fusión recombinantes y conjugados unidos químicamente. Un adaptador proteínico 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 residuos de ácido de aproximadamente 25 aminoácidos. La longitud del enlazador seleccionado dependerá de una variedad de factores, tales como, por ejemplo, para el que se está seleccionando la propiedad o propiedades deseado el enlazador (véase, por ejemplo Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev. 65: 1357-1369 (2013)).

50

55 Los enlazadores adecuados pueden ser no proteínico, tal como, por ejemplo, enlazadores químicos (véase, por ejemplo Dosio F et al, toxinas 3: 848-83 (2011); Feld J et al, Oncotarget 4:.. 397-412 (2013)). Varios enlazadores no proteínicos conocidos en la técnica se pueden usar para enlazar los polipéptidos efectores de toxina Shiga a restos moleculares mayores de 20 kiloDaltons, tales como enlazadores comúnmente usados para conjugar polipéptidos de inmunoglobulina a polipéptidos heterólogos. Por ejemplo, los componentes polipeptídicos de las moléculas de la presente invención pueden estar ligados usando las cadenas laterales funcionales de sus residuos de aminoácidos y restos de carbohidrato tales como, por ejemplo, un carboxi, amina, sulfhidrilo, ácido carboxílico, carbonilo, hidroxilo, y/o grupos de anillos cíclicos. Por ejemplo, enlaces disulfuro y enlaces tioéter se pueden usar 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, los residuos de aminoácidos no naturales se pueden utilizar con otras cadenas laterales funcionales, tales como grupos cetona (véase, por ejemplo Axup J et al, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 109: 16101-6 (2012); Sun S et al., Chembiochem Jul 18 años (2014); Tian F et al, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos. 111: 1766-1771 (2014)). Los ejemplos de enlazadores químicos no proteicos incluyen, pero no se limitan a N-succinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato, S- (N-succinimidilo) tioacetato (SATA), N-succinimidil-oxycarbonil-cu-metil-a- (2 -pyridyldithio) tolueno (SMPT), N-succinimidil 4- (2-piridilditio) pentanoato (SPP), succinimidil 4- (N-maleimidometil) carboxilato de ciclohexano (SMCC o MCC), sulfosuccinimidil (4-yodoacetil)

65

aminobenzoato, 4 -succinimidilo-oxicarbonil- $\alpha$ - (2-piridilditio) tolueno, sulfosuccinimidil-6- ( $\alpha$ -metil- $\alpha$ - (piridilditio) -toluamido) hexanoato, N-succinimidil-3 - (- 2-piridilditio) -propionate (SPDP) , succinimidil 6 (3 (- 2-piridilditio) -propionamido) hexanoato, sulfosuccinimidil 6 (3 (- 2-piridilditio) -propionamido) hexanoato, maleimidocaproil (MC), maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (ácido 3-maleimidobenzoico MC-vc-PAB), éster de N-hidroxisuccinimida (MBS), derivados de alquilo alfa, sulfoNHS-ATMBA (sulfosuccinimidil N- [3- (acetiltio) -3-metilbutiril-beta-alanina]), sulfodichol orphenol, 2-iminotiolano, 3- (2-piridilditio) propionil hidrazida, reactivo de Ellman, ácido dichlorotriazinic, 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 Estados Unidos 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, si proteínico o no proteínico, puede incluir, por ejemplo, sensible a la proteasa, redox ambiental potencial sensible, sensible al pH, escindibles, fotoescindible, y/o enlazadores sensibles al calor de ácido (véase por ejemplo Dosio F et al, toxinas. 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 invención. Por ejemplo, los polipéptidos componentes de la invención o de sus subcomponentes pueden estar unidas 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 los residuos de aminoácidos con residuos polares, no cargados, y/o cargados, tales como, por ejemplo, treonina, prolina, glutamina, glicina y alanina (véase, por ejemplo Huston J et al. Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 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 proteináceos incluyen alanina-serina-glicina-glicina-prolina-glutamato (ASGGPE) (SEQ ID NO: 117), valina-metionina (VM), alanina-metionina (AM), AM (G<sub>2 a 4</sub> S)<sub>x</sub> AM (SEQ ID NO: 118), 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, como para optimizar uno o más de la molécula de fusión de plegado, la estabilidad, la 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, enlazadores proteináceos pueden seleccionarse basándose en la flexibilidad, la rigidez, y/o 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 enlazador al 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, enlazadores proteináceos pueden ser seleccionados que permiten la deseados interacciones no covalentes entre los componentes polipeptídicos de las moléculas de la invención, tales como, por ejemplo, interacciones relacionadas con los dímeros de formación y otros multímeros de orden superior (ver por ejemplo, US 4.946.778).

Los enlazadores proteicos flexibles son a menudo mayor que 12 residuos de aminoácidos de largo y rico en residuos, no polar de aminoácidos pequeños, residuos de aminoácidos polares, y/o residuos de aminoácidos hidrófilos, tales como, por ejemplo, glicinas, serinas y treoninas (ver por ejemplo R Bird 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)). 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 especialista, y se componen de múltiples glicinas y/o uno o más serinas, a veces en unidades de repetición, tales como, por ejemplo, (G<sub>x</sub> S)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 119), (S<sub>x</sub> G)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 120), (GGGGS)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 121), y (G)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 122), 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: 123), GSTSGSGKSSSEGKG (SEQ ID NO: 124), GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (SEQ ID NO: 125), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 126), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 127), SRSSG (SEQ ID NO: 128), y SGSSC (SEQ ID NO: 129).

Los enlazadores proteicos rígidos son a menudo estructuras rígidas alfa-helicoidales y rica en residuos de prolina y/o uno o más prolinas colocados 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 específica del entorno inestabilidad (ver Dosio F et al, toxinas. 3: 848-83 (2011); Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)). *In vivo* enlazadores escindibles proteicos son capaces de desvinculación por el procesamiento proteolítico y/o 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)). *In vivo* enlazadores escindibles proteicos a menudo comprenden motivos sensible a la proteasa y/o enlaces disulfuro formados por uno 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)). *In vivo* enlazadores proteicos escindibles pueden ser diseñados para ser sensible a las proteasas que sólo existen en ciertos lugares en un organismo, o compartimentos dentro de una célula, y/o que se vuelven activos sólo en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas (tales como, por ejemplo, proteasas con niveles anormalmente altos, proteasas sobreexpresados 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, RXXR motivo y AMGRSGGGCAGNRVGSLSLSCGGLNLQAM (SEQ ID NO: 116).

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

Los enlazadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, sensible a la proteasa, redox ambiental potencial sensible, sensible al pH, escindible ácido, fotoescindible, y/o enlazadores 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 señaladas por Zarlring 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 para la disociación dentro de un compartimento subcelular de una célula diana. Por ejemplo, enlazadores que comprenden uno o más grupos tritilo, grupos tritilo derivatizados, grupos bismaleimideotoxi propano, grupos de dihidrazida de ácido adípico, y/o grupos de transferrina de ácido lábil, 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 se escinden en intervalos de pH que corresponden a diferencias de pH fisiológicos 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 nitrobenzilo carbonilo, 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 moléculas de la invención, un resto dirigido a las células, por ejemplo, una región de unión, se une a una región del polipéptido efector de la toxina Shiga usando cualquier número de medios conocidos para el experto, incluyendo enlaces covalentes y no covalentes (véase, por ejemplo . Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013); Behrens C, Liu B, MAbs 6: 46-53 (2014)).

En ciertas realizaciones de las moléculas de la invención, la molécula comprende una región de unión dirigida a células que es un scFv con un enlazador que conecta un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) y un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>). Hay numerosos enlazadores conocidos en la técnica adecuados para este propósito,

tales como, por ejemplo, el péptido de 15 residuos (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 130). Los enlazadores de scFv adecuados que pueden ser utilizados en la formación de estructuras multivalentes no covalentes incluyen GGS, GGGs (Gly<sub>3</sub>Ser o G<sub>3</sub>S) (SEQ ID NO: 131), GGGGS (Gly<sub>4</sub>Ser o G<sub>4</sub>S) (SEQ ID NO: 132), GGGGSGGG (SEQ ID NO: 133), GGSGGG (SEQ ID NO: 134), GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 135), y GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO: 136) (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)).

La unión de los componentes de las moléculas de la invención puede ser mediante cualquier procedimiento actualmente conocido en la técnica para llevarlo a cabo, siempre que la unión no impida sustancialmente la internalización celular de la molécula y/o la función o funciones deseadas del efector de toxina de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga, tal como se mide por un ensayo apropiado, incluyendo los ensayos como se describe en el presente documento.

Para los objetivos de las moléculas dirigidas a células de la presente invención, el orden o la orientación específica no es fijo para la región del polipéptido efector de la toxina Shiga y la región de unión en relación la una a la otra o toda la molécula (ver por ejemplo, Figura 1) a menos que específicamente se indique lo contrario. Los componentes de las moléculas dirigidas a células de la presente invención pueden estar dispuestos en cualquier orden siempre que las actividades deseadas de la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga no se eliminen. Las actividades deseadas incluyen proporcionar a la molécula con 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 algunas de las realizaciones anteriores de las moléculas de la invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga, el resto molecular, y opcionalmente, el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico pueden estar directamente unidos entre sí y/o adecuadamente unidos entre sí a través de una o más secuencias de polipéptidos intermedias, tales como con uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento. En las realizaciones anteriores de las moléculas dirigidas a células de la invención, las regiones del polipéptido efector de la toxina Shiga, las regiones de unión, y otros componentes presentes en ciertas realizaciones (por ejemplo, resto molecular y/o motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico) pueden estar directamente unidos el uno al otro 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.

## II. Ejemplos de variaciones estructurales específicas de componentes de moléculas de la invención

En ciertas realizaciones, la región del polipéptido efector de la toxina Shiga de las moléculas de la presente invención comprende o consiste esencialmente en una subunidad A de la toxina Shiga truncada, tal como se define en las reivindicaciones. Los truncamientos de la subunidad A de la toxina de tipo Shiga son catalíticamente activos, capaz de inactivar los ribosomas enzimáticamente *in vitro*, y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005); Di R et al., Toxicon 57: 525-39 (2011)). Se mostró que el fragmento de la subunidad A de la toxina Shiga truncado carboxi terminal compuesto de los residuos 1-240 de SLT-1A mostraba citotoxicidad completa cuando se expresó en el retículo endoplásmico de una célula eucariota, ya que el residuo de leucina en la posición 240 se requiere una construcción de subunidad A de la toxina Shiga truncada carboxi terminal para retrotranslocarse eficazmente al citosol de una célula eucariota (LaPointe P et al, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Del mismo modo, se mostró que el fragmento de subunidad A de la toxina Shiga truncada carboxi terminal compuesto de residuos 1-239 de Stx2A mostraba citotoxicidad completa cuando se expresaba en el retículo endoplásmico de una célula eucariota (Di R et al, Toxicon 57: 525-39 (2011)).

Entre ciertas realizaciones, la región de polipéptido toxina efector Shiga de una molécula de la presente invención comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 75 a 240 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o stxA (SEQ ID NO: 2) o que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 75 a 239 de SLT-2A (SEQ ID NO: 3). Otras formas de realización son moléculas que comprenden un polipéptido toxina efector Shiga que comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 240 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o stxA (SEQ ID NO: 2) o que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 239 de SLT-2A (SEQ ID NO: 3). Otras formas de realización son moléculas que comprenden un polipéptido toxina efector Shiga que comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 240 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o stxA (SEQ ID NO: 2), así como uno o más aminoácidos carboxi-terminal de la posición 240, pero no carboxi terminal de la posición 250; y, de manera similar, otras formas de realización son moléculas que comprenden un polipéptido toxina efector Shiga que comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 239 de SLT-2A (SEQ ID NO: 3), así como uno o más aminoácidos carboxi terminal de la posición 239 pero no carboxi terminal de la posición 249.

Entre ciertas realizaciones, la región de polipéptido toxina efector Shiga de una molécula de la presente invención comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o stxA (SEQ ID NO: 2) o que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 250 de SLT-2A (SEQ ID NO: 3), en el que

residuo de ácido al menos un amino se interrumpe en el motivo escisión por furina en el extremo carboxi terminal de la toxina Shiga región derivada fragmento A1. Otras formas de realización son moléculas que comprenden una resistente a escisión por proteasa, Shiga región toxina efector que comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 261 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o stxA (SEQ ID NO: 2) o que comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1 a 260 de SLT-2A (SEQ ID NO: 3), en el que residuo de ácido al menos un amino se interrumpe en el motivo escisión por furina en el extremo carboxi terminal de la toxina Shiga región derivada fragmento A1.

Entre ciertas realizaciones de las moléculas dirigidas a células de la presente invención, la molécula dirigida a células comprende una región de unión derivado de un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado por específico y de alta afinidad de unión a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula de cáncer, donde el antígeno está restringido de expresión a las células cancerosas (véase Glokler J et al, las moléculas 15: 2478-90 (2010); Liu Y et al, Lab chip de 9: 1033-6 (2009)). De acuerdo con otras formas de realización, se selecciona la región de unión para específico y de alta afinidad de unión a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde el antígeno es sobre-expresado o preferencialmente expresado por las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas. Algunas biomoléculas diana representativas incluyen, pero no se limitan a, los siguientes objetivos enumerados asociados con cánceres y/o tipos de células inmunes específicos.

Existen muchas regiones de unión de tipo inmunoglobulina que reconocen epítopos asociados con células cancerosas en la técnica anterior, tales como las regiones que se dirigen a CD4, CD20 (proteína de antígeno de linfocitos B CD20), CD22, CD25 (receptor de interleucina 2 IL2R), CD30 (unión TNFRSF8), CD38 (cíclico ADP ribosa hidrolasa), CD40, CD44 (receptor de hialuronano), CD71 (receptor de transferrina), CD73, CD79, endoglina (FIN o CD105), CD200, célula basal molécula de adhesión (B-CAM o CD239), CD248 (endosialina o TEM1), proteína de antígeno carcinoembrionario (CEA), la condroitina sulfato proteoglicanos 4 (CSP4, MCSP, o NG2), factor de crecimiento epidérmico receptor (EGFR/ErbB1), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/Neu/ErbB2/CD340), Efrina receptor de tipo-B 2 (EphB2), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), proteína de activación de fibroblastos (FAP/seprasa), activados por proteasa-receptores (tales como PARI), virus de la polio de tipo receptor 4 (PVRL4), B3 antígeno de melanoma, antígeno de melanoma B4, proteína de antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), y tumor-Asocia transductores de la señal de calcio TED (TACSTDs) (véase, por ejemplo Lui B et al, Cancer Res. 64: 704-10 (2004); Bagley R et al, Int J Oncol 34: 619-27 (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 está destinado a ser no limitativo. Se apreciará por el experto en la materia que cualquier biomolécula diana deseada asociado con una célula de cáncer o de otro tipo de célula deseado se puede usar para diseñar o seleccionar una región de unión para ser acoplado con la región toxina efector Shiga para producir una molécula de la invención.

Ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con células de cáncer y han regiones de unión de tipo inmunoglobulina sabe que se unen ellos incluyen CD19 (proteína de antígeno de linfocitos B CD19), CD21 (receptor del complemento-2 o complementan receptor 3d), CS1 (familia SLAM número 7 o SLAMF7), CD26 (dipeptidil peptidasa-4, DPP4, o adenosina desaminasa complejante proteína 2), CD33 (siálico de unión a ácido de tipo inmunoglobulina lectina-3), CD52 (CAMPATH-1 antígeno), CD56, CD133 (prominin -1), moléculas de adhesión celular basal (BCAMs o Lutheran glicoproteínas de grupos sanguíneos, antígeno tumoral vesical (BTA), antígeno de cáncer de testículo-NY-ESO-1, las proteínas LAGE antígeno de cáncer de testículo, de la superficie celular A33 proteína de antígeno (gpA33), hepatocitos receptor del factor de crecimiento (HGFR o c-Met), Epstein-Barr proteínas antígeno del virus, el antígeno de proteína asociado a melanoma 1 (MAGE-1), antígeno 3 asociado a melanoma (MAGE-3), proteínas GAGE /PAGE (melanoma asociado cáncer/antígenos de testículo), proteínas BAGE (antígenos B de melanoma), mucinas (tales como MUC1 y antígeno de cáncer 125 (-125 CA)), expresados preferentemente de antígeno de melanoma (PRAME) proteínas, antígeno de melanoma reconocido por células T 1 proteína (MART-1/MelanA), proteína de antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de células madre de próstata proteína (PSCA), receptor para la glucosilación avanzada Endroducts (RAGE), glicoproteína asociada a tumor 72 (TAG-72), y el antígeno de tumor de Wilms.

Ejemplos de otros biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con células de cáncer son, anhidrasa carbónica IX (CA9/CAIX), proteínas de unión a folato (FBPs y receptores de folato), gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), integrinas alfa-V beta-3 ( $\alpha_V\beta_3$ ), integrinas alfa-V beta-5 ( $\alpha_V\beta_5$ ), integrinas alfa-5 beta-1 ( $\alpha_5\beta_1$ ), receptor tirosina-proteína cinasa erb-3, similar a la insulina factor de crecimiento 1 receptor (IGF1R), tipo-A ephrin receptor 3 (EphA3), tumor necrosis receptor del factor de 10A (TRAIL-R1/DR4), receptor del factor de necrosis tumoral 10B (TRAIL-R2), activador del receptor del nuclear factor de kappa B (RANK), tenascina C, claudin proteínas (CLDN3, CLDN4), mesotelina (MSLN), y CD64 (Fc $\gamma$ RI) (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); Scot. t A et al, Cancer Immun 12: 14-22 (2012)). Esta lista de biomoléculas diana está destinado a ser no limitativo.

Además, existen numerosos otros ejemplos de contempladas, biomoléculas diana, como la proteína de melanocitos PMEL (gp100), tirosinasa humana, proteína relacionada con la tirosinasa-1 (TYRP1 o TRP1), proteína relacionada

con tirosinasa 2 (TRP-2), lysophosphatidglycerol aciltransferasa 1 (LPGAT1/IAA0205), proteínas SART, ADP-ribosyltransferases (ART1, ART4), aspartil humana (asparaginil) beta-hidroxilasa (HAAH), tipo-A ephrin receptor 2 (EphA2), receptor tirosina-proteína quinasa erbB-3, antígeno asociado a la tirosinasa (TAA), romper clúster punto región-c-abl oncogén (BCR-ABL) proteínas, metaloproteinasas de ADAM (por ejemplo, ADAM-9, ADAM-10, ADAM-12, ADAM-15, ADAM-17), alfa- antígeno fetoproteína proteína 17-A1, los antígenos de estroma de médula ósea (BST1, BST2), CD2, CD3 (células T co-receptor), CD7, CD15, CD23 (FC epsilon RII), CD53, CD88 (complemento componente 5a receptor 1) , CD129 (interleucina 9 receptor), CD183 (receptor de quimioquinas CXCR3), CD191 (CCR1), CD193 (CCR3), CD244 (Natural Killer Cell receptor 2B4), CD294 (GPR44), CD305 (leu kocyte asociada similar a inmunoglobulina del receptor 1), C3aR (receptores del complemento componente 3a), FcεR1a, galectina-9, proteína-14 (MRP-14), Siglecs (lectinas de unión a ácido siálico relacionados mieloides de tipo inmunoglobulina), CD49d, CD13, CD54 (molécula de adhesión intercelular 1), CD63 (tetraspanin), CD69, CD123 (interleucina-3 receptor), CD284 (receptor Toll-like 4), FcεR1a, lisosoma asociada a proteínas de membrana (lámparas, tales como CD107), CD203c , CD14, CD15 (Lewis X o etapa específica de antígeno embrionario 1) receptores scavenger, (tales como CD64 y CD68), CD80, CD86, CD115 (factor estimulante de colonias 1 receptor), F4/80, similar a una inmunoglobulina transcripción ILT-3 , integrinas (como CD11a-c), CD195 (receptor de quimioquina CCR5), CD282 (toll-like receptor 2), syndecans (tales como SDC1 o CD138), y CD225 (transmembrana de proteína inducida por interferón 1) (véase, Scott A et al, Cancer Immun. 12: 14 (2012)); . Cheever M et al, Clin Cancer Res 15: 5323-37 (2009), para biomoléculas diana y tenga en cuenta 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 acoplado con un resistente a la escisión por proteasa, toxina Shiga región efectora para producir una molécula de la invención.

En ciertas realizaciones, la región de unión comprende o consiste esencialmente en un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado por 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 porque se unen 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 interleucina 2 (IL-2R), activador del factor nuclear kappa B (RANKL) receptor, proteína asociada a SLAM (SAP), y TNFSF18 (ligando del factor de necrosis tumoral 18 o GITRL).

Para ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 50-61. Estas realizaciones de moléculas dirigidas a células, citotóxicas, que se unen a CD20 resistente a la escisión por proteasa pueden usarse para tratar y/o diagnosticar el cáncer de hueso, leucemia, linfoma, melanoma, mieloma, 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/o vasculitis.

En ciertas realizaciones, la región de unión comprende o consiste esencialmente en un ligando seleccionado para dirigir un receptor extracelular. Algunos ligandos representativos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes proteínas morfogenéticas óseas e inhibidor de activina unido a la membrana BAMBI (también conocido como TGFB), CD137L (también conocido como 41BB), receptor señuelo 3 DcR3 (también conocido como TR6 y TNFRSF6B), secuencias relacionadas con el polipéptido MHC de clase I (por ejemplo, MICA, MICB), ligandos de NKG2D (por ejemplo, ULBP1, ULBP2, ULBP3 y ULBP4-6) y factor de necrosis tumoral TWEAK (también conocido como TNFSF12 y APO3L). Para más ligandos de ejemplos no limitativos, véase la Tabla 5 en los Ejemplos.

Entre ciertas realizaciones de las moléculas dirigidas a células de la presente invención, la región de unión es una región derivada de inmunoglobulina de dominio único V<sub>H</sub>H que exhibe unión de alta afinidad específicamente a HER2, tal como se deriva de una región variable de dominio único de la proteína 5F7 del anticuerpo de camélido (V<sub>H</sub>H), tal como se describe en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2011/0059090.

En ciertas realizaciones, las moléculas que se dirigen a células de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 270-513 de la SEQ ID NO: 50, 261-512 de la SEQ ID NO: 51, 270-514 de SEQ ID NO: 52, o 279 a 522 de la SEQ ID NO: 53, todos los cuales exhiben la unión específica con alta afinidad a CD20 humano.

En ciertas realizaciones, las moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 267-384 de la SEQ ID NO: 54, 269-512 de la SEQ ID NO: 58, o 269- 403 de la SEQ ID NO: 61, todos los cuales exhiben la unión específica con alta afinidad a HER2 humano.

En ciertas realizaciones, las moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden el ligando polipéptido que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-401 de la SEQ ID NO: 56, que exhibe la unión específica con alta afinidad a receptor de interleucina 2 (receptor de IL-2) humano.

En ciertas realizaciones, las moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-508 de la SEQ ID NO: 57, que exhibe la unión específica con alta afinidad a CD38 humano.

En ciertas realizaciones, las moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-516 de la SEQ ID NO: 59, que exhibe la unión específica con alta afinidad a CD19 humano.

En ciertas realizaciones, las moléculas dirigidas a células de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-518 de la SEQ ID NO: 60, que exhibe la unión específica con alta afinidad a CD74 humano.

Está dentro del alcance de la presente invención el uso de fragmentos, variantes, y/o derivados que contienen un sitio de unión a biomolécula diana extracelular funcional, e incluso más preferiblemente capaces de unirse a la biomolécula diana con alta afinidad (por ejemplo, tal como se muestra por  $K_D$ ). Por ejemplo, aunque la divulgación proporciona secuencias de polipéptidos que se pueden unir a proteínas humanas: CD20, HER2, receptor de IL-2, CD38, CD19, y CD74, cualquier región de unión que se une a una biomolécula diana, expresada preferentemente 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 moléculas dirigidas a células de la invención y procedimientos de la invención.

### III. Funciones generales de las moléculas de la invención

La presente invención proporciona varios citotóxicos, moléculas dirigidas a células que comprenden resistente a la escisión por proteasa, toxina Shiga A polipéptidos efectores de subunidades, que son útiles para aplicaciones de diagnóstico terapéutico y/o. La toxina Shiga derivados, dirige a una célula moléculas de la presente invención puede ser diseñado para tener citotoxicidad óptima, es decir, equivalente a una molécula dirigida a células que comprende una de tipo salvaje, polipéptido toxina Shiga efector pero con mejoras con respecto a ciertas moléculas dirigidas a células que comprenden proteasa -cleavage, de tipo salvaje sensible, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga (por ejemplo, moléculas de células dirigidas que comprenden carboxi terminal, célula de metas de regiones de unión). La resistente a la escisión por proteasa, las moléculas de la toxina Shiga una subunidad derivada proporcionados en este documento tienen usos, por ejemplo, para la destrucción de células diana, la entrega de materiales exógenos en tipos de células específicos, la obtención de información de diagnóstico, y como agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos, y condiciones, incluyendo cánceres, trastornos del sistema inmunitario, y las infecciones microbianas.

La unión de regiones de unión dirigidas a células con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa permite la ingeniería de terapias y diagnósticos con características mejoradas, tales como, por ejemplo, célula de metas de moléculas con mayor estabilidad molecular y mejorado, tolerabilidad *in vivo*. La interrupción del motivo escisión por furina en el extremo carboxi de la región del fragmento A1 toxina Shiga en toxina Shiga A polipéptidos subunidad efectoras reduce de escisión de furina en el motivo y podría reducir la escisión por otras proteasas lado de furina, tales como, por ejemplo, tripsina y extracelular proteasas común en el sistema vascular de los vertebrados. La interrupción del motivo escisión por furina en el extremo carboxi de la región del fragmento A1 toxina Shiga en toxina Shiga A polipéptidos subunidad efectoras permite la ingeniería de moléculas dirigidas a células con células de tipo direccionamiento específico de toxina Shiga citotoxicidad comparable en potencia a Cell- moléculas de direccionamiento comprenden escisión por furina, polipéptidos toxina efectoras sensibles Shiga pero con perfiles de toxicidad mejorados después de la administración a un vertebrado frente a ciertas moléculas dirigidas a células que comprenden una escisión por proteasa sensible, de tipo salvaje, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga. Ciertas moléculas de la presente invención exhiben reducidos efectos nocivos (por ejemplo, toxicidad no específica) después de la administración a vertebrados, en comparación con moléculas dirigidas a células que comprenden de tipo salvaje, polipéptidos toxina efectoras Shiga y podría exhibir una estabilidad mejorada durante la producción, el almacenamiento y la administración.

#### A. Reducción de la sensibilidad de la escisión por proteasa de polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga manteniendo al mismo tiempo eficiente un enrutamiento intracelular eficiente y una citotoxicidad potente

Anteriormente, se creía que citotóxico toxina Shiga A Subunidad construcciones que comprenden fragmento A1 toxina Shiga regiones catalíticas debe mantener o de alguna manera compensar el procesamiento proteolítico de origen natural por la furina en las células intoxicadas con el fin de preservar la citotoxicidad eficiente y potente. Inesperadamente, se descubrió que el evento de escisión de furina no era necesario para potente citotoxicidad porque potente citotoxicidad de la toxina Shiga en el nivel de un tipo salvaje, Shiga construcción de control toxina se logró en la ausencia de un acontecimiento del de escisión de furina diana mediada por células en el extremo carboxi del fragmento A1 toxina Shiga pesar de la presencia de un relativamente grande (mayor que 28 kDa) resto en el extremo carboxi terminal (véanse los Ejemplos, infra). Se esperaba que la falta de un evento de escisión por furina dentro de la célula intoxicada para interferir con la liberación eficiente de un fragmento A1 de la

toxina Shiga y, por tanto, dar lugar a la continua vinculación de un resto relativamente grande, molecular a la región del fragmento A1 toxina Shiga. Sin embargo a pesar de esta expectativa, toxina potente citotoxicidad Shiga se logró con escisión por furina deficiente, toxina Shiga A Subunidad construcciones que comprenden restos relativamente grandes, carboxi terminales y carente de cualquier característica compensatoria aparente (s), tales como, por ejemplo, una, sitio de proteasa alternativa diseñada.

Estos resultados son sorprendentes debido a que el proceso de toxina intoxicación óptima Shiga fue pensado para requerir la liberación de la toxina Shiga fragmentos A1 de todas las otras fracciones moleculares grandes y la exposición del extremo carboxi terminal del fragmento A1 a retrotranslocarse eficientemente fragmentos A1 liberadas desde el retículo endoplásmico a la citosol, donde los fragmentos A1 pueden formar una estructura enzimáticamente activa que catalíticamente inactiva los ribosomas de la célula intoxicada. En particular, la persistencia y/o la liberación ineficaz de un resto molecular que cubre el extremo carboxi terminal del fragmento A1 toxina Shiga se esperaba para interferir con el mecanismo natural del A1 fragmento de la toxina Shiga de obtener eficientemente el acceso al citosol que implica la exposición del fragmento de A1 dominio carboxi terminal hidrófobo reconocido por el sistema ERAD (ver Di R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011); Li S et al, *PLoS One* 7: e41119 (2012)). Por ejemplo, se esperaba que la persistencia de un resto molecular que cubre el extremo carboxi terminal del fragmento A1 toxina Shiga para alterar la accesibilidad del extremo carboxi terminal del fragmento A1 toxina Shiga a la maquinaria ERAD en el retículo endoplasmático y el acceso ganando de manera eficiente al citosol donde se forma una estructura enzimáticamente activa. Inesperadamente, esta se encuentra que es incorrecto porque eficiente y potente toxina Shiga citotoxicidad se logró en ausencia de un evento de escisión mediada por la diana por células, la furina en el extremo carboxi del fragmento A1 toxina Shiga a pesar de la presencia de un gran, carboxi- terminal, célula-resto que elige diana (véanse los Ejemplos, infra).

Alternativamente, la falta de un evento mediada por células intoxicado, escisión por furina puede ser compensada hipotéticamente para. ejemplos de potencial no limitantes, los enfoques compensatorios incluyen 1) que termina un extremo carboxilo terminal de la construcción con el extremo carboxi terminal de una región polipéptido fragmento de toxina similar a A1 Shiga, 2) producción de la construcción de toxina Shiga derivada de tal manera que la toxina Shiga Un polipéptido Subunidad ya está mellado cerca del extremo carboxi terminal de su A1 polipéptido fragmento de toxina semejante a Shiga, 3) la ingeniería de un sitio de proteasa heteróloga y/o ectópico que puede sustituir funcionalmente por la falta de la toxina Shiga, evento nativo, escisión por furina, y 4) una combinación de enfoques dos y tres. En el primer enfoque, el carboxi terminal del polipéptido fragmento de toxina similar a A1 Shiga no está cubierto por cualquier resto carboxi terminal, y, por tanto, el extremo carboxi terminal de la toxina Shiga polipéptido fragmento similar a A1 se expone de forma permanente para el reconocimiento por la maquinaria ERAD en el retículo endoplásmico. En los últimos tres enfoques, el polipéptido fragmento de toxina similar a A1 Shiga puede ser diseñado para disociarse intracelularmente a partir de uno o más de otros componentes de la construcción en el momento en la molécula alcanza el retículo endoplasmático de una célula intoxicada de tal manera que en el retículo endoplásmico el carboxi terminal del polipéptido fragmento de toxina semejante a Shiga A1 queda expuesta para el reconocimiento por la maquinaria ERAD.

Un ejemplo de una característica de compensación es molécula citotóxica que comprende una toxina Shiga Un polipéptido efector subunidad que se trata previamente con una proteasa para nick la región polipéptido cerca del extremo carboxi de la región del fragmento similar a A1 antes de poner en contacto una célula diana. Otro ejemplo es una molécula citotóxica que comprende un polipéptido efector A subunidad toxina Shiga diseñados para tener que comprende una, heterólogo, sitio de proteasa ectópico que se escinde por una proteasa intracelular de la célula diana.

Estos enfoques propuestos para el diseño de toxina Shiga A polipéptidos efectores de subunidades que compensan la falta de un evento mediada por células intoxicado, escisión por furina son hipotéticos. Todos los cuatro enfoques propuestos podrían alterar significativamente la eficiencia y la potencia de la citotoxicidad en comparación con una molécula que comprende una de tipo salvaje, toxina Shiga A de la subunidad o la toxina Shiga Una construcción de subunidad que comprende solamente secuencias de tipo salvaje que incluyen el sitio de escisión por furina de origen natural en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. Además, sólo ciertas variantes del tercer enfoque, las variantes que se basan en endoproteasas célula diana, podrían permitir un resto que ser fusionado en una posición carboxi terminal con respecto al polipéptido efector de la toxina Shiga. Sin embargo, actualmente no existe un enfoque compensatorio depender de una célula diana endoproteasa distinta de la furina se conoce que puede proporcionar equivalente citotoxicidad totalmente compensatoria a furina escisión y proteasas celulares alternativos como la calpaína han demostrado ser menos eficaz en la facilitación de Shiga citotoxicidad toxina (Garred Ø et al. , *Exp Cell Res* 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, *J Biol Chem.* 270: 10817-21 (1995); Kurmanova, *Biochem Biophys Res Commun* 357: 144-9 (2007)).

Las moléculas de la presente invención que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga que comprenden motivos de escisión por furina alterados todas muestran una sensibilidad reducida a la escisión por furina. Debido a que el motivo R/Y-x-x-R de escisión por furina es compartido por múltiples proteasas, tales como por proteasas altamente promiscuos (por ejemplo, tripsina), se espera que ciertos motivos de escisión por furina alterados de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención exhiban sensibilidad reducida a la escisión por múltiples proteasas, además de sólo furina (véase, por ejemplo Kurmanova a et al, *Biochem Biophys Res Commun*

357: 144-9 (2007)). Por ejemplo, la clase de peptidasas de proproteína convertasa incluye al menos siete miembros en los seres humanos, PC1, PC2, PC3, PC4, PACE4, PC5, PC6, y PC7 (Fugere M, Día R, Trends Pharmacol Sci 26: 294-301 (2005)), muchos de los cuales son conocidos para escindir sus sustratos individualmente o pares de residuos básicos, tales como, por ejemplo, uno o más residuos de arginina (Seidah N, Ann NY Acad Sci 1220: 149-61 (2011)).

Ciertas moléculas dirigidas a células de la presente invención son tan citotóxicas de forma eficiente y potente como moléculas dirigidas a células que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga sensibles a escisión por proteasa, a pesar de la presencia de un resto molecular fusionado al carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga que no puede ser liberado por la escisión de furina en el interior de una célula intoxicada.

#### B. Eliminación celular a través de citotoxicidad de toxina Shiga dirigida

La presente invención proporciona diversas moléculas dirigidas a células, citotóxicas, que comprenden polipéptidos efectores de la subunidad A de toxina Shiga resistente a la escisión por furina, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, las moléculas dirigidas a células de la presente invención son capaces de unirse a biomoléculas diana extracelulares asociadas a la superficie celular de tipos de células particulares y entrar en esas células. Una vez interiorizadas dentro de un tipo de célula específica, ciertas realizaciones de las moléculas dirigidas a células de la invención son capaces de enrutar 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 moléculas dirigidas a células de la invención son capaces de inactivar enzimáticamente los ribosomas y finalmente matar a la célula. Este sistema es modular en que cualquier número de diversas regiones de unión dirigidas a células, tales como, por ejemplo, los polipéptidos de tipo inmunoglobulina, se pueden utilizar para apuntar a esta potente citotoxicidad para varios tipos de células diversas, mientras que proporciona la mejora de la reducción de la sensibilidad a la escisión por proteasa. La capacidad de una molécula 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 las moléculas dirigidas a células citotóxicas, resistentes a la escisión por proteasa, de la presente invención, tras poner en contacto una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de una molécula citotóxica de la invención (diana + células), la molécula dirigida a células es capaz de causar la muerte de la célula. La muerte de células se puede realizar usando una molécula dirigida a células 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 cultivado *in vitro*, o una célula diana *in vivo*.

La expresión de la biomolécula diana no tiene que ser nativa a fin de que la muerte celular dirigida por una molécula dirigida a células citotóxica de la presente 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, viral adenoviral adeno-asociado, 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 puede ser inducida mediante la exposición de una célula a la radiación ionizante (Wattenberg M et al, Br J Cancer. 110: 1472-1480 (2014)).

Para los propósitos de la presente invención, la exposición de la citotoxicidad efectora de la toxina Shiga "equivalente" en comparación con la citotoxicidad de una segunda molécula dirigida a células que comprende un polipéptido de fragmento A1 de toxina Shiga de tipo salvaje se refiere a un nivel de citotoxicidad dentro de diez por ciento o menos, tal como se mide por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad comparable a un polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje, que comprende un fragmento A1 de toxina Shiga de longitud completa. Para la citotoxicidad en un ensayo de muerte de células positivas diana en cultivo de células de laboratorio, citotoxicidad "equivalente" es típicamente un valor  $CD_{50}$  dentro del diez por ciento del valor  $CD_{50}$  de una molécula dirigida a células citotóxica de referencia (denominada en este documento como "segunda molécula dirigida a células"), que comprende una región de unión idéntica a la molécula de interés y, en su caso, un resto molecular idéntico a la molécula de interés; y en el que la región de unión, el polipéptido efector de la toxina Shiga y, en su caso, al resto molecular de la molécula de referencia están todos asociados entre sí de forma idéntica con cómo estos componentes están asociados en la molécula de interés.

Además, si una molécula dirigida a células de la presente invención exhibe citotoxicidad equivalente a una molécula dirigida a células de referencia que comprende un polipéptido del fragmento A1 de la toxina Shiga, entonces la región del polipéptido efector de la toxina Shiga de esa molécula de la invención presenta la actividad efectora de la toxina Shiga de direccionamiento subcelular a un nivel de actividad equivalente al nivel de actividad de direccionamiento subcelular de esa molécula de referencia, es decir, una actividad de direccionamiento subcelular

equivalente al de tipo salvaje.

### C. Citotoxicidad selectiva entre los tipos de células

5 Al dirigir la liberación de polipéptidos efectores de a subunidad A de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa utilizando regiones a tipos de células específicas con alta afinidad, se puede limitar la potente actividad de eliminación de células de toxina Shiga para eliminar preferentemente tipos de células dirigidas específicamente. Ciertas moléculas dirigidas a células de la presente invención son útiles para la eliminación de poblaciones de tipos de células específicas. Por ejemplo, las moléculas dirigidas a células, citotóxicas, de la invención son útiles para el tratamiento de ciertos tumores, cánceres y/o anomalías en el crecimiento mediante la eliminación de células malignas que expresan niveles elevados de una biomolécula diana particular en una o más superficies celulares.

15 En ciertas realizaciones, la administración de la molécula dirigida a células de la presente invención a una mezcla de tipos de células, la molécula dirigida a células es capaz de matar selectivamente las células que se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular en comparación con los tipos de células no acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular. Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para matar las células eucariotas, las moléculas diseñadas usando polipéptidos efectores de subunidad A de toxina Shiga pueden mostrar actividad citotóxica potente. Al dirigir la entrega de polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga enzimáticamente activos a tipos de células específicos utilizando regiones de unión de alta afinidad, esta actividad de muerte celular potente puede ser restringida dentro de un organismo para matar solamente aquellos tipos de células deseadas como diana por su asociación física con una biomolécula diana de las regiones de unión elegidas.

25 En ciertas realizaciones, la molécula dirigida a células de la presente invención es capaz de causar selectivamente o preferencialmente la muerte de un tipo de célula específico dentro de una mezcla de dos o más tipos de células diferentes. Esto permite que la actividad citotóxica dirigida a determinados tipos de células con una alta preferencialidad, tales como un efecto citotóxico de 3 veces, sobre tipos de células "observadoras" 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 para ser dirigidas. 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 "observadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana o no se acoplan físicamente a cantidades significativas de la biomolécula diana.

35 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. Tal 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, 70000 de intensidad de fluorescencia promedio (MFI) mediante análisis FACS en función del tipo de célula.

45 En ciertas realizaciones adicionales, la administración de la citotóxico, dirige a una célula molécula de la presente invención a dos poblaciones de tipos de células que difieren en la secuencia de presencia y/o polipéptido de una biomolécula diana extracelular, la molécula dirigida a células es capaz de causar célula de muerte como se define por la concentración citotóxica media-máxima ( $CD_{50}$ ) en una población de células diana, cuyos miembros expresar una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula dirigida a células, por ejemplo, a una dosis por lo menos tres veces menor que el  $CD_{50}$  dosis de la misma molécula de célula-targetingd a una población de células cuyos miembros no expresar una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula dirigida a células.

50 En ciertas realizaciones, la actividad citotóxica de una molécula dirigida a células 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 extracelular biomolécula diana unido específicamente por esa molécula dirigida a células 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 de un tipo celular específico acoplado físicamente con una biomolécula diana de la región de unión a (b) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo de célula no acoplado físicamente con una biomolécula diana de la región de unión. En ciertas realizaciones, la relación de la 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, o 1.000 veces mayor para las poblaciones de células o tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión en comparación con las poblaciones de células o tipos de células no acoplados físicamente con una biomolécula diana de la región de unión. 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 secuencia de presencia y/o polipéptido de una biomolécula diana extracelular, el molécula dirigida a células citotóxica de la invención es capaz de causando la muerte celular de los tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular

obligado por región de unión de la proteína citotóxica, por ejemplo, en una  $CD_{50}$  que es al menos tres veces menor que el  $CD_{50}$  observada para tipos de células que no se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular obligado por el citotóxico, región de unión de molécula dirigida a células o a tipos de células que se acoplan físicamente únicamente con formas de que biomolécula diana extracelular que comprenden variaciones de secuencias o mutaciones que alteran la especificidad de unión por la región de unión de esa célula de segmentación molécula.

En ciertas realizaciones de las moléculas dirigidas a células de la presente invención, tras la administración de la molécula dirigida a células a dos poblaciones diferentes de tipos de células, la molécula dirigida a células es capaz de causar la muerte celular tal como se define por la concentración citotóxica media-máxima ( $CD_{50}$ ) sobre una primera población de células, cuyos miembros expresan una biomolécula diana de la región de unión de la molécula dirigida a células en una superficie celular, a una dosis por lo menos tres veces menor que el  $CD_{50}$  dosis de la misma por células la orientación molécula a una segunda población de células cuyos miembros no expresan cualquier biomolécula diana de la región de unión de la molécula dirigida a células, no expresan una cantidad significativa de cualquier biomolécula diana de la región de unión de la molécula dirigida a células, o son no exponer una cantidad significativa de cualquier biomolécula diana de la región de unión de la molécula dirigida a células.

Esta función de eliminación celular preferencial permite que una célula diana sea eliminada por ciertas moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención bajo condiciones variadas y en presencia de células oobbservadoras no diana, como mezclas manipuladas de tipos de células *ex vivo*, tejidos cultivados *in vitro* con mezclas de tipos de células, o *in vivo* en la presencia de múltiples tipos de células (por ejemplo, *in situ* o en una ubicación nativa dentro de un organismo multicelular).

#### D. Tolerabilidad y estabilidad *In vivo* mejorada

Las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención exhiben una mayor estabilidad y/o tolerabilidad *in vivo* mejorada en comparación con análogos sensibles a escisión por furina, tal como se define en las reivindicaciones. El aumento de la estabilidad puede mostrarse *in vitro* y/o *in vivo*.

La estabilidad de una molécula terapéutica o de diagnóstico con el tiempo es una característica importante y puede afectar a qué aplicaciones se puede emplear la molécula. La estabilidad molecular incluye *in vitro* e *in vivo*, tal como, por ejemplo, la estabilidad dentro de un organismo después de la administración y durante el almacenamiento en un rango de temperaturas y concentraciones. Para ciertas inmunotoxinas o fusiones de ligando-toxina, la estabilidad del enlace entre la toxina y otros componentes puede afectar a la cantidad de toxicidad no específica causada por la liberación de la toxina no dirigida con el tiempo dentro del cuerpo de un organismo.

Ciertas moléculas dirigidas a células de la invención son útiles como agentes terapéuticos y/o diagnósticos y exhiben una toxicidad no específica reducida *in vivo*, que se manifiesta como una mejor tolerabilidad, *in vivo*, en comparación con más variantes sensibles a escisión por proteasa. En tolerabilidad vivo puede ser determinada por el experto en la materia usando técnicas conocidas en la técnica y/o descritos en el presente documento. Además de evaluar la tolerabilidad vivo usando la mortalidad, signos de morbilidad se pueden usar para evaluar la tolerabilidad vivo, tal como, por ejemplo, los aspectos de peso corporal, apariencia física, signos clínicos medibles, el comportamiento no provocado, y las respuestas a los estímulos externos (véase por ejemplo Morton D, Griffiths P, Vet Rec 116: 431-43 (1985); Montgomery C, Cancer Bull 42: 230-7 (1990); Ullman-Culleré M, Foltz C, Lab Anim Sc 49: 319-23 (1999); Clingerman K, Summers L, J Am Assoc Lab Anim Sci 51: 31-6 (2012)). La eutanasia puede ser utilizada en respuesta a los signos de morbilidad y/o morbundity y, por lo tanto, crear un punto de tiempo de la mortalidad. Por ejemplo, una disminución en el peso corporal de 15-20% en 2-3 días se puede utilizar como un signo de la morbilidad en roedores y como una justificación para la eutanasia (véase, por ejemplo Institute of Laboratory Animal Guía de Investigación 2011. para el cuidado y uso de animales de laboratorio, octava edición, Washington, DC, Estados Unidos: National Academies Press (2011)).

Para los propósitos de la invención reivindicada, el término "mejorado, en tolerabilidad vivo" se refiere a una disminución reproducible y estadísticamente significativa en la toxicidad y/o efecto perjudicial general de la molécula en la salud o la supervivencia de un organismo completo después de recibir la administración de la molécula, tal como una disminución de 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o mayor, preferiblemente 50% o mayor, de la molécula mejorado a un organismo mamífero en comparación con una molécula de referencia cuando se compara usando el mismo ensayo bajo las mismas condiciones, por ejemplo la misma especie, la misma dosis y la dosis acumulativa, el mismo programa de dosificación, y la misma duración para los puntos de tiempo de observación y/o medición. Una disminución en la toxicidad o efecto perjudicial general puede ser medida por una disminución de la mortalidad y/o morbilidad más de duración de tiempo específica.

Como se muestra en los Ejemplos, un descenso de la toxicidad podría representar% de supervivencia 100 a una duración de tiempo determinado para los mamíferos que reciben la molécula con la mejora de la tolerabilidad, *in vivo*, en comparación con 100% de mortalidad en el mismo punto de tiempo para los mamíferos que reciben la molécula de referencia. La mortalidad puede ser debido a la muerte o la eutanasia por razones humanitarias como se mencionó anteriormente. En general, la pauta de administración es de dos a tres dosis por semana para 2, 3, 4, o

más semanas, donde cada dosis es de alrededor de 0,001 a 40 mg de molécula por kg de peso corporal.

La tolerabilidad in vivo mejorada observada para moléculas ejemplares, dirigidas a células de la invención sugiere que dosis mucho más altas de estas moléculas dirigidas a células se pueden administrar de manera segura a mamíferos en comparación con las dosis de moléculas relacionadas que comprenden una escisión por furina sensible, Shiga polipéptido efector toxina. Certain dirige a una célula moléculas de la invención pueden exhibir toxicidad no específica reducida en comparación con las variantes más sensibles a la escisión por proteasa debido a que la resistencia a la escisión por proteasa sirve para proteger y preservar el vínculo entre el componente de toxina efector Shiga y el componente de resto dirigido a las células.

Además, ciertas moléculas de la invención presentan un aumento de la vida media, tanto *in vitro* y/o *in vivo*, en comparación con más variantes sensibles a escisión por proteasa. La estabilidad Molecular puede someterse a ensayo mediante la determinación de la vida media de una molécula de interés con respecto a la asociación de sus componentes. Ciertas realizaciones de las moléculas de la invención tendrán vidas medias más largas en comparación con escisión por furina variantes sensibles, especialmente con respecto a la asociación continua de la componente de toxina Shiga efector y uno o más de otros componentes. Por ejemplo, ciertas formas de realización de las moléculas de la invención tendrán semividas más largas en relación con la asociación continua de la componente de toxina Shiga efector y otro componente, por ejemplo un resto dirigido a las células, en comparación con un tipo furina escisión variante sensible en donde el sitio sensible escisión por furina (s) se encuentra entre estos dos componentes.

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

Además de la muerte celular directa, ciertas moléculas de la presente invención opcionalmente se pueden usar para la entrega de materiales exógenos adicionales en el interior de las células diana. La entrega de materiales exógenos adicionales se puede utilizar, por ejemplo, para citotóxico, estimulación del sistema inmunitario citostático, la focalización de células inmunes, recopilación de información, y/o funciones de diagnóstico. Las variantes no tóxicas de las moléculas citotóxicas de la presente invención, o variantes opcionalmente citotóxicas, pueden utilizarse para entregar los materiales exógenos adicionales y/o etiquetar los interiores de las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de una molécula dirigida a células. Varios tipos de células y/o poblaciones de células que expresan biomoléculas diana a al menos una superficie celular pueden ser dirigidos por las moléculas dirigidas a células de la invención para la recepción de materiales exógenos. Los componentes funcionales de las moléculas dirigidas a células de la presente invención son modulares, en que los diversos polipéptidos toxina efectoras Shiga y materiales exógenos adicionales pueden estar relacionadas con diferentes regiones de unión para proporcionar diversas aplicaciones, tales como no invasiva de imágenes *in vivo* de las células tumorales y/o sus compartimentos subcelulares.

Debido a que la dirige a una célula moléculas de la presente invención, incluyendo formas no tóxicas de los mismos, son capaces de entrar en las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular reconocido por región de unión de la molécula dirigida a células, ciertas realizaciones de las moléculas dirigidas a células de la invención pueden ser usado para entregar materiales exógenos adicionales en el interior de tipos de células específicas. En un sentido, toda la molécula de la invención es un material exógeno que entrar en la célula; Por lo tanto, los materiales exógenos "adicionales" son materiales heterólogos ligados a pero distintas de la molécula dirigida a células propio núcleo. Los polipéptidos efectoras de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa de la invención que no son tóxicos todavía pueden ser útiles como componentes de moléculas dirigidas a células para la entrega de materiales exógenos en células diana siempre que la resistente a la escisión por proteasa, Polipéptido efector de la toxina Shiga dirige eficientemente enrutamiento intracelular al citosol de una célula en la que está presente.

Variantes y derivados de moléculas citotóxicas y moléculas dirigidas a células de la presente invención que difieren sólo en el residuo catalíticamente importante, aminoácido (s) de forma nativa posicionada en 75, 77, 114, 167, 170, 176, y 203 (o el correspondiente posición en relacionados con la toxina Shiga subunidades, por ejemplo, la posición 204 en SLT-2A) tendrá el mismo nivel de actividad de direccionamiento subcelular en comparación con las moléculas parentales de tipo salvaje, los residuos de aminoácidos en absoluto de la posición (s) que son diferentes.

"Material exógeno adicional" tal como se utiliza aquí se refiere a una o más moléculas, a menudo no presente generalmente dentro de una célula diana nativo, en donde las moléculas 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 pequeños agentes quimioterapéuticos molécula.

En ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención para la entrega de material exógeno adicional, el material exógeno adicional es un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, un pequeño agente quimioterapéutico molécula, antibiótico citotóxico, agente, antimetabolito, inhibidor de la topoisomerasa, y alquilación/o un inhibidor de tubulina. Los ejemplos no limitantes de agentes citotóxicos incluyen aziridinas, cisplatins, tetrazinas, procarbazona, hexametilmelamina, alcaloides de la vinca, taxanos, camptotecinas, etopósido, doxorubicina, mitoxantrona,

tenipósido, novobiocina, aclarrubicina, antraciclinas, actinomicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina, dolastatinas, maitansinas, docetaxel, adriamicina, caliqueamicina, auristatinas, pirrolobenzodiazepine, 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 pequeño ARN inhibidora (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 de células T complementarias. Por ejemplo, materiales exógenos incluyen antígenos, como los característicos de las células presentadoras de antígeno infectadas por bacterias, y de células T complementaria regiones determinantes capaces de funcionar como antígenos exógenos. Ejemplos adicionales de materiales exógenos incluyen polipéptidos y proteínas más grandes que un péptido antigénico, tales como enzimas. Los materiales exógenos que comprenden polipéptidos o proteínas pueden comprender opcionalmente uno o más antígenos conocidos o desconocidos para el experto.

En ciertas realizaciones, el resto molecular de una molécula de la presente invención comprende o consiste esencialmente en un material exógeno adicional.

#### F. Recopilación de información para funciones de diagnóstico

Ciertas moléculas dirigidas a células de la presente invención tienen usos en la detección *in vitro* y/o *in vivo* de células específicas, tipos de células, poblaciones de células, y/o compartimentos subcelulares específicos de las mencionadas anteriormente. Las dirigidas a células descritas en este documento se pueden utilizar tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, o para el diagnóstico solo. Cuando se utiliza la misma molécula dirigida a células tanto para el diagnóstico y el tratamiento, las variantes de moléculas dirigidas a células que incorporan agentes promotores de la detección para el diagnóstico pueden volverse no tóxicas por la inactivación catalítica de un polipéptido efector de la toxina Shiga a través de una o más sustituciones de aminoácidos, incluyendo sustituciones de ejemplo descritas en este documento. Las formas no tóxicas de las moléculas dirigidas a células 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 utilizados en conjunción con un régimen terapéutico que comprende la misma o una región de unión relacionada.

La capacidad para conjugar agentes de detección promover conocidos en la técnica a diversas moléculas dirigidas a células de la presente invención proporciona composiciones útiles para la detección de cáncer, tumor, inmune, y las células infectadas. Estas formas de realización de diagnóstico de las moléculas dirigidas a células de la 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 moléculas dirigidas a células de la invención pueden ser utilizadas para la recopilación de información a través de imágenes de los orgánulos intracelulares (por ejemplo endocítica, Golgi, retículo endoplásmico, y los compartimentos citosólicos) de células individuales de cáncer, células inmunes, o células infectadas en un paciente o biopsia muestra.

Varios tipos de información pueden ser recogidos utilizando las realizaciones de diagnóstico de las moléculas dirigidas a células 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 terapéuticos de la enfermedad de un paciente, el ensayo de la progresión de las terapias anti-neoplásicas en el tiempo, el ensayo de la progresión de las terapias inmunomoduladoras en el tiempo, el ensayo de la progresión de las terapias antimicrobianas durante tiempo, la evaluación de la presencia de células infectadas en los materiales de trasplante, la evaluación de la presencia de tipos de células 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 moléculas dirigidas a células de la presente invención, y a continuación los pacientes individuales podrían clasificarse adicionalmente en subpoblaciones en base a su(s) característica(s) reveladas utilizando las realizaciones de diagnóstico. Por ejemplo, la eficacia de productos farmacéuticos o terapias podría ser un tipo de criterio usado para definir una subpoblación de pacientes. Por ejemplo, una variante de diagnóstico no tóxica de una molécula dirigida a células citotóxica particular de la invención puede ser utilizada para diferenciar qué pacientes están en una clase o subpoblación de pacientes predichas para responder positivamente a una variante citotóxica de la misma molécula de la invención. En consecuencia, los procedimientos asociados para la identificación del paciente, la estratificación del paciente, y el diagnóstico usando moléculas dirigidas a células de la invención, incluyendo variantes no tóxicas de moléculas dirigidas a células citotóxicas de la invención, tal como se describen en el presente documento.

Las moléculas dirigidas a células de la presente invención son útiles en procedimientos (por ejemplo, procedimientos de la muerte celular, el suministro de materiales exógenos adicionales, y/o detección de compartimentos

subcelulares específicos de tipos de células específicas) que implican células diana que expresan la furina y/o una proteasa de tipo furina, de manera que la furina y/o una proteasa de tipo furina está presente en el compartimiento subcelular de la célula diana seleccionada del grupo que consiste en: aparato de Golgi, endosoma, y el retículo endoplásmico. Las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención se pueden utilizar para matar células que expresan la furina. Las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención se pueden utilizar para matar las células deficientes en furina y exhiben una mejor tolerabilidad *in vivo* cuando se administran a un vertebrado.

#### IV. Variaciones en la secuencia del polipéptido de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa en las moléculas dirigidas a células de la invención

El experto en la materia reconocerá que pueden hacerse variaciones a los componentes de polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa en las moléculas dirigidas a células de la presente invención (moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención, así como polinucleótidos que codifican cualquiera de los primeros) sin disminuir sus actividades biológicas, por ejemplo, mediante el mantenimiento de la estructura general y la función del polipéptido efector de la toxina Shiga y/o molécula dirigida a células, tal como, por ejemplo, una o más funciones efectoras de la toxina Shiga, la función o funciones dirigidas a células, unión a biomolécula diana, actividad citotóxica específica, mejora en la tolerabilidad *in vivo*, mayor estabilidad, y/o la capacidad de suministrar material(es) exógeno(s) a células diana.

Por ejemplo, algunas modificaciones pueden facilitar la expresión, purificación, y/o 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 convenientemente localizados de restricción o codones de terminación, y etiquetas de afinidad bioquímicas fusionadas a cualquiera de los extremos para proporcionar la detección y/o purificación conveniente.

También se contempla en el presente documento es la inclusión de residuos de aminoácidos adicionales en el extremo amino y/o carboxi, tales como secuencias de epítopo etiquetas u otros restos. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden ser utilizados para diversos fines, incluyendo, por ejemplo, para facilitar la clonación, expresión, modificación postraduccional, la síntesis, purificación, detección y/o la administración. dominios de la proteína de unión de quitina, sitios enteropeptidasa de escisión, los sitios de escisión del Factor Xa, etiquetas flash, etiquetas FLAG, proteínas verde fluorescente (GFP), restos de glutatión-S-transferasa, etiquetas de HA, de unión a maltosa: Ejemplos de etiquetas de epítopo y restos no son limitantes dominios de la proteína Myc, etiquetas, etiquetas, etiquetas de polihistidina reash, strep-tag, etiqueta strep-II, los sitios de la proteasa TEV, dominios de tiorredoxina, sitio de escisión de trombina, y las etiquetas de epítopo V5.

En ciertas de las realizaciones anteriores, las secuencias de polipéptidos de la escisión por proteasa resistente, Shiga componente polipéptido toxina efector de una molécula de la presente invención es variada por una o más sustituciones conservativas de aminoácidos, siempre que el polipéptido efector de la toxina Shiga conserva un alterado motivo escisión por furina y siempre que las exposiciones de polipéptidos toxina efectoras Shiga, solas y/o como un componente de una molécula dirigida a células, una o más funciones toxina efectoras Shiga seleccionan de uno o más de los siguientes: enrutamiento intracelular, la actividad catalítica, y/o citotoxicidad. En ciertas de las realizaciones anteriores, las secuencias de polipéptidos de las moléculas dirigidas a células de la presente invención son variados por uno o más sustituciones conservativas de aminoácidos introducidos en una región (s) polipéptido de la región polipéptido toxina efector Shiga conserva una escisión por furina alterado motivo y el tiempo que la región de unión extracelular conserva la especificidad de unión biomolécula diana.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustitución conservativa" se refiere a que uno o más aminoácidos se sustituyen por otro, biológicamente residuo de aminoácido similar. 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 con un residuo no se encuentran normalmente en, péptidos y proteínas de mamífero endógenos es la sustitución conservativa de un residuo de arginina o lisina con, por ejemplo, ornitina, canavanina, aminoetilcisteína, u otro aminoácido básico. Para más información relativa a sustituciones fenotípicamente silenciosas en los péptidos y las 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	D	H	C	F	N	A	C	F	A	C	A	A	D
G	E	K	I	W	Q	G	M	H	C	D	C	C	E
P	Q	R	L	Y	S	I	P	W	F	E	D	D	G
S	N		M		T	L		Y	G	H	G	E	K
T			V			V			H	K	N	G	P
									I	N	P	H	Q
									L	Q	S	K	R
									M	R	T	N	R
									R	T	V	Q	S
									T	Y	V	R	T
									W			S	
									Y			T	

5 En ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa y/o moléculas de la presente invención pueden comprender fragmentos funcionales o variantes de una región de polipéptido de la invención que tienen, como máximo, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácido en comparación con una secuencia de polipéptido indicada en este documento, 1), siempre que el polipéptido efector de la toxina Shiga conserve un motivo de escisión por furina alterado y siempre que el polipéptido efector de la toxina Shiga muestre, solo y/o como un componente de una molécula dirigida a células, un nivel razonable de la(s) función(es) efectora(s) de toxina Shiga relacionadas con el enrutamiento intracelular, la actividad catalítica, y/o la citotoxicidad; y 2), siempre que la molécula dirigida a células comprenda una región de unión que retiene especificidad de unión a la biomolécula diana extracelular, tal como se define en las reivindicaciones. Las variantes de los componentes de polipéptidos efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa de las moléculas dirigidas a células de la presente invención se describen como resultado del cambio de un polipéptido de la molécula 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 dirigida a una célula o el polipéptido efector de la toxina Shiga, con el fin de conseguir las propiedades deseadas, tales como citotoxicidad cambiada, efectos citostáticos cambiados, inmunogenicidad cambiada y/o semivida en suero cambiada. Un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y/o la molécula de la invención pueden estar adicionalmente con o sin una secuencia señal.

25 En ciertas realizaciones, los componentes de polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa de las moléculas de la presente invención comparten al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de la identidad de secuencia de aminoácidos con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de un polipéptido mencionado en el presente documento, siempre que el polipéptido efector de la toxina Shiga conserve un motivo de escisión de furina alterado y siempre que el polipéptido efector de la toxina Shiga, solo y/o como un componente de una molécula dirigida a células, retenga una actividad biológica medible, tal como, por ejemplo, enrutamiento subcelular, la citotoxicidad, la catálisis enzimática y/o inactivación catalítica de los ribosomas, dentro del alcance de las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, las moléculas dirigidas a células de la presente invención comparten 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 un polipéptido indicado en el presente documento, siempre que su región de polipéptido efector de toxina Shiga conserve un motivo de escisión por furina alterado y siempre que la molécula dirigida a células conserve una actividad biológica medible, tal como, por ejemplo, enrutamiento subcelular, citotoxicidad, unión a biomolécula diana extracelular, internalización celular, catálisis enzimática, y/o inactivación catalítica de ribosomas, dentro del alcance de los ribosomas.

40 En ciertas realizaciones, los componentes de polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa de las moléculas de la presente invención pueden alterarse para cambiar su actividad enzimática y/o citotoxicidad, siempre que conserven un motivo de escisión por furina alterado y siempre que muestre, solo y/o como un componente de una molécula dirigida a células, la función efectora de la toxina Shiga seleccionada de una o más de las siguientes: enrutamiento intracelular, actividad catalítica, y/o citotoxicidad, dentro del alcance de las reivindicaciones. Este cambio puede dar lugar o no a un cambio en la citotoxicidad del polipéptido efector de la toxina Shiga o molécula citotóxica de la que el polipéptido efector de la toxina Shiga alterado es un componente. Posibles alteraciones incluyen mutaciones en el polipéptido efector de la toxina Shiga seleccionadas del grupo que consiste en: un truncamiento, delección, inversión, inserción, reordenamiento, y sustitución, siempre que se conserve un motivo de escisión por furina alterado y el polipéptido efector de la toxina Shiga conserve, solo y/o como un componente de una molécula dirigida a células, la función efectora de la toxina Shiga seleccionada de uno o más de los siguientes: enrutamiento intracelular, actividad catalítica, y/o citotoxicidad.

50 Las moléculas de la presente invención como se define en las reivindicaciones comprenden cada uno un resistente a la escisión por proteasa, Shiga región polipéptido toxina efector que retiene una función de toxina efector Shiga (por ejemplo, enrutamiento intracelular al citosol), pero en ciertas realizaciones se pueden diseñar a partir de un parental

citotóxico molécula a una molécula con la citotoxicidad disminuida o abolida para funciones no citotóxicas, por ejemplo, citostasis efectuar, entrega de materiales exógenos, y/o la detección de tipos de células, mediante la mutación de uno o más restos clave para la actividad enzimática.

5 La actividad catalítica y/o citotóxica de las subunidades de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede ser disminuida o eliminada por mutación o truncamiento. Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en la toxina Shiga subunidades han sido asignadas a los siguientes residuos posiciones: asparagina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, y la arginina-176 entre otros (di R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). En particular, una construcción de doble mutante de Stx2A que contiene glutamato-E167-a-lisina y arginina-176-a-lisina mutaciones estaba completamente inactivada; mientras que, muchas mutaciones individuales en Stx1 y Stx2 mostraron una reducción de 10 veces en la citotoxicidad. 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 Estados Unidos* 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 elimina la actividad enzimática de SLT-I A1 en un ensayo de ribosoma inactivación libre de células (LaPointe P et al, *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 y arginina-170 eliminado SLT-I citotoxicidad fragmento A1 en ese nivel de expresión (LaPointe P et al, *J Biol Chem* 280: 23310 -18 (2005)).

20 En ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa y/o moléculas dirigidas a células de la invención deriva de o que comprenden un componente derivado de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2), el efector de toxina Shiga comprende una alteración de las secuencias de la toxina Shiga de tipo salvaje, tales como, por ejemplo, uno o más de la siguiente(s) sustitución(ess): 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 alanina, sustitución del glutamato en la posición 167 en aspartato, la sustitución de la arginina en la posición 170 a alanina, sustitución de la arginina en la posición 176 a la lisina, y/o sustitución del triptófano en la posición 203 a alanina, siempre que el motivo de la escisión por furina alterado permanezca alterado y que el polipéptido efector de la toxina Shiga conserve, solo y/o como un componente de una molécula dirigida a células, la función efectora de la toxina Shiga seleccionada de uno o más de los siguientes: enrutamiento intracelular, actividad catalítica, y/o citotoxicidad. Otras mutaciones que o bien aumentan o bien reducen la actividad enzimática y/o la citotoxicidad de la toxina Shiga, dentro del alcance de las reivindicaciones, están dentro del alcance de la presente invención y se pueden determinar usando técnicas y ensayos bien conocidos descritos en este documento.

40 En ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención, uno o más residuos de aminoácidos pueden ser mutados, insertados o eliminados con el fin de aumentar la actividad enzimática de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa, siempre que el motivo de escisión por furina alterado permanezca alterado, dentro del alcance de las reivindicaciones. Por ejemplo, la mutación de la posición de residuo de alanina-231 en Stx1A a glutamato aumentó su actividad enzimática *in vitro* (Suhan M, Hovde C, *Infect Immun* 66: 5252-9 (1998)), pero no va a restaurar la sensibilidad a la escisión por furina.

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

#### 50 V. Producción, fabricación, y purificación de polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y moléculas que comprenden los mismos

La escisión por proteasa, componentes de polipéptido efector de toxina Shiga resistentes y moléculas dirigidas a células de la invención pueden ser producidos utilizando técnicas de ingeniería bioquímicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y moléculas dirigidas a células de la invención pueden ser fabricados por procedimientos estándar de síntesis, mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes, o por cualquier otro procedimiento adecuado. Por lo tanto, Shiga polipéptidos toxina efectoras y moléculas dirigidas a células de la invención pueden sintetizarse en un número de maneras, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que comprenden: (1) sintetizar un componente polipéptido o polipéptido de una proteína utilizando en fase líquida en fase sólida estándar o metodología, ya sea por etapas o por el conjunto de fragmento, y aislar y purificar el polipéptido final o producto de proteína; (2) que expresa un polinucleótido que codifica un componente de polipéptido o polipéptido de una molécula de la invención (por ejemplo, polipéptido o proteína) en una célula huésped y recuperar el producto de expresión de la célula huésped o cultivo de células huésped; o (3) la expresión *in vitro* de un polinucleótido que codifica una molécula de la invención libre de células (por ejemplo, una célula de orientación por polipéptido o proteína), y la recuperación del producto de expresión; o por cualquier combinación de los procedimientos de (1), (2) o (3) para obtener fragmentos del componente peptídico, posteriormente de unión (por ejemplo, ligadura) los fragmentos para obtener el componente de péptido, y la

recuperación del componente peptídico. Por ejemplo, polipéptido y/o componentes de péptidos se pueden ligaron entre sí utilizando reactivos de acoplamiento, tales como, por ejemplo, N, N'-diciclohexilcarbodiimida y N-etil-5-fenil-isoxazolio-3 'sulfonato (reactivo de Woodward K).

5 Puede ser preferible sintetizar un resistente a la escisión por proteasa, polipéptido toxina Shiga efector o un componente de polipéptido o polipéptido de una molécula dirigida a células de la invención por medio de fase sólida o síntesis de péptidos en fase líquida. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y moléculas dirigidas a células de la invención pueden convenientemente ser fabricados por procedimientos sintéticos estándar. Así, los péptidos se pueden sintetizar por procedimientos, por ejemplo, que comprenden sintetizar el péptido por fase sólida estándar o  
10 metodología en fase líquida, el montaje fragmento ya sea paso a paso o por, y aislar y purificar el producto peptídico final. En este contexto, puede hacerse referencia a WO 1998/11125 o, entre otras cosas, Fields G et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis (péptidos sintéticos, Grant G, ed., Oxford University Press, Reino Unido, segundo ed., 2002) y los ejemplos de síntesis en el mismo.

15 Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa y moléculas dirigidas a células de la invención pueden prepararse (producirse y purificarse) usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. En general, se describen en los procedimientos para preparar polipéptidos mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que comprende el polinucleótido que codifica y recuperar el polipéptido del cultivo de células, por ejemplo, Sambrook J et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (Press, NY, Estados Unidos, 1989); Dieffenbach C et al, PCR Primer: A Laboratory Manual  
20 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, Estados Unidos, 1995). Cualquier célula huésped adecuada se puede usar para producir un polipéptido efector de la toxina Shiga y/o molécula dirigida a células citotóxica de la invención. Las células huésped pueden ser células estable o transitoriamente transfectadas, transformadas, transducidas o infectadas con uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de un polipéptido de una molécula de la invención. Además, un Shiga polipéptidos toxina efectoras y/o citotóxica de células de metas de molécula de la invención pueden ser producidos mediante la modificación del polinucleótido que codifica la molécula dirigida a células citotóxica de la invención que resultan en la alteración de uno o más aminoácidos o eliminar o insertar uno o más aminoácidos con el fin de conseguir las propiedades deseadas, tales como cambio de citotoxicidad, cambiaron efectos citostáticos, cambiaron la inmunogenicidad, y/o cambiado vida media en suero.

30 Hay una amplia variedad de sistemas de expresión que pueden ser seleccionados para producir una proteína dirigida a células citotóxica de la presente invención. Por ejemplo, los organismos huésped para la expresión de proteínas de la invención incluyen procariontas, tales como *E. coli* y *B. subtilis*, células eucariotas, tales como levaduras y hongos filamentosos (tales 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 de células vegetales, y organismos eucariotas, tales como plantas transgénicas (como *A. thaliana* y *N. benthamiana*).

35 Por consiguiente, la presente divulgación también proporciona procedimientos para producir polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa y/o molécula de la invención (por ejemplo, polipéptido o proteína) de acuerdo con los procedimientos anteriormente citados y el uso de (i) un polinucleótido que codifica una parte o la totalidad una molécula de la invención o un componente de polipéptido de la misma, (ii) un vector de expresión que comprende al menos un polinucleótido de la invención capaz de codificar parte o la totalidad de una molécula de la invención o un componente de polipéptido de la misma cuando se introduce en una célula huésped adecuada o sistema de expresión libre de células, y/o (iii) una célula huésped que comprende un polinucleótido de la presente invención o vector de expresión de la divulgación.  
45

50 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 son de alta pureza o son sustancialmente homogénea. La purificación se puede lograr por 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, carga de separación por columna de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía en sílice o de intercambio catiónico resinas tales como DEAE y similares, cromatografía de afinidad, y proteína a Sepharose cromatografía para eliminar los contaminantes), y técnicas de precipitación (por ejemplo precipitación con etanol o precipitación con sulfato de amonio). Cualquier número de técnicas de purificación bioquímicos se puede usar para aumentar la pureza de un polipéptido efector de toxina Shiga y/o molécula de la invención (por ejemplo, un polipéptido efector toxina Shiga, proteína específica por células, o una molécula dirigida a células de la invención). En ciertas realizaciones, la célula de metas de moléculas de la invención opcionalmente se puede purificar en formas homo-multimérico (es decir, un complejo de proteínas de dos o proteínas o moléculas dirigidas a células de la invención más idéntico) o en formas hetero-multimérico (es decir, una complejo de proteínas de dos o más proteínas no idénticas o moléculas dirigidas a células de la invención).  
60

65 En los ejemplos siguientes son descripciones de ejemplos de procedimientos no limitante para la producción de una molécula dirigida a células de la invención, así como aspectos específicos pero no limitativos de la producción para moléculas ejemplares de la invención (por ejemplo, de una sola cadena, polipéptidos de fusión) .

VI. Composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden una molécula dirigida a células citotóxica resistente a la escisión por proteasa de la invención

5 La presente invención proporciona moléculas dirigidas a células citotóxicas para su uso, solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en una composición farmacéutica, para el tratamiento o la profilaxis de afecciones, enfermedades o trastornos definidos en las reivindicaciones, descritos en más detalle a continuación (por ejemplo, cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, anomalías del crecimiento, trastornos inmunes, y las infecciones microbianas). La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que  
10 comprenden un molécula dirigida a células de la invención, citotóxica, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, tal como se define en las reivindicaciones, junto con como mínimo un portador, excipiente, o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención puede comprender formas homo-multiméricas y/o hetero-multiméricas de las moléculas o moléculas dirigidas a células de la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención son útiles en procedimientos de tratamiento, la mejora o la prevención de una enfermedad, afección, trastorno o síntoma que se describe en más detalle a continuación. Cada uno 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 invención proporciona además composiciones farmacéuticas para uso en al menos un procedimiento de tratamiento de acuerdo con la invención, tal como se describe en más detalle a continuación.

20 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.).

30 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.

45 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.

60 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 de la molécula o composición terapéutica (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 portador o portadores 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 una composición de materia 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 molécula de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, y uno o más agentes promotores de detección. 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 molécula de la invención en cualquier posición. La incorporación del agente puede ser a través de un residuo o residuos de aminoácidos de la molécula citotóxica 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 molécula dirigida a células 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 moléculas 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  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{51}\text{Mn}$ ,  $^{52}\text{mMn}$ ,  $^{52}\text{Fe}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{73}\text{Se}$ ,  $^{75}\text{Br}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{82}\text{mRb}$ ,  $^{83}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{89}\text{Zr}$ ,  $^{94}\text{mTc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{110}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{120}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{154}\text{Gd}$ ,  $^{155}\text{Gd}$ ,  $^{156}\text{Gd}$ ,  $^{157}\text{Gd}$ ,  $^{158}\text{Gd}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ , y  $^{223}\text{Rn}$ , 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 composición de diagnóstico que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa

Sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la presente invención están asimismo dentro del alcance de la presente invención.

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 moléculas 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 molécula 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

5 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 molécula que se dirige a una célula u otro componente farmacéutico pueden recubrirse en un material destinado a proteger la molécula de la acción del pH bajo y otras condiciones de inactivación natural en las que la molécula activa se puede encontrar cuando se administra a un paciente por una vía de administración particular.

20 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la 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 composiciones farmacéuticas y moléculas terapéuticas de la invención descritas en este documento.

30 Las composiciones farmacéuticas de la 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.

40 Una composición farmacéutica de la 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.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o una combinación de diferentes moléculas de la invención, tal como se definen en las reivindicaciones, o un éster, sal o amida de cualquiera de los anteriores, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 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.

65 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.

5 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de una molécula 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 la molécula activa 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  
10 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.

15 Cuando se diseña una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula 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.

25 Tal como se describe en otra parte en el presente documento, una molécula de la presente invención o composición de la misma (por ejemplo, composición farmacéutica o de diagnóstico) se pueden preparar con vehículos que protegerán la molécula 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, poliolefinas 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)).

35 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 molécula 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 direccionamiento de ejemplo incluyen folato o biotina; manósidos; anticuerpos; receptor de la proteína A surfactante; p120 catenina y similares.

45 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.

50 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden producirse usando técnicas conocidas en el sector, de manera que las composiciones producidas comprenden emulsiones, liposomas, niosomas, nanopartículas poliméricas y/o nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) (véase, por ejemplo Lakshmi P et al., Venereal Leprol 73: 157-161 (2007); A Revolution in Dosage Form Design and Development, Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems (Sezer A, ed, InTech, 2012)).

60 Comúnmente, las composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas comprenden liposomas dispersos en un medio acuoso (véase, por ejemplo Li S et al, J Control Release 126: 77-84 (2008); Li S et al, Mol Ther 16: 163-9 (2008); Chen Y et al, J Invest Dermatol 130: 2790-8 (2010); Chen Y et al, J Biol Chem 285: 22639-50 (2010)). Los liposomas y las nanopartículas pueden ser mediante la incorporación de dominios de inmunoglobulina, receptores, y/o ligandos durante su producción (véase dirigida por células por ejemplo, Khan D et al, Biología Química y Drug Design 71: 3-7 (2008); Rezler E et al., revista de la American Chemical Society 129: 4961-72 (2007); Khan D, Diario de la Ciencia del cáncer y terapia. 2: 58-62 (2010); van der Meel R et al, J control Release 159: 281-9 (2012); Sada S et al, Curr cáncer Crug Targets 15: 71-86 (2015)).

65 Comúnmente, SLNs comprenden lípidos tales como cera de parafina y glicéridos biodegradables (véase, por

ejemplo Attama A et al, Int JPharm 304: 4-10 (2005)). SLNs se pueden cargar con citotóxico, dirige a una célula moléculas de la invención usando procedimientos conocidos para el experto, tales como, por ejemplo, mediante el uso de conjugados de lípidos-terapéutico en forma de nanopartículas (véase, por ejemplo Müller R et al., Eur J Pharm Biopharm 41: 62-9 (1995); Friedrich I et al, Int JPharm 305: 167-75 (2005); Schubert MA et al, Eur J Pharm Sci. 27: 226-36 (2006); Attama A et al., Eur J Pharm Biopharm 64: 294-306 (2006); Attama A, Müller-Goymann C, Int JPharm 322: 67-78 (2006); Attama A et al, Int JPharm 355: 307-13 (2008) ; Attama A et al, J Drug Deliv Sci Technol. 18: 181-8 (2008); Attama A et al, Current Eye Res 34: 698-705 (2009); patente de Estados Unidos 8.663.692).. En particular, SLNs pueden incorporar compuestos hidrófilos que comprenden polipéptidos de la toxina derivada de Shiga unidos a célula-focalización, regiones de unión (véase, por ejemplo Müller R et al, Eur J Pharm Biopharm. 41: 62-9 (1995)). SLNs que comprenden copolímeros de HPMA se pueden diseñar para dirigirse a compartimentos subcelulares después de la internalización celular (véase, por ejemplo Jensen K et al, J Control Release. 87: 89-105 (2003)).

#### VII. Polinucleótidos de la invención, vectores de expresión y células huésped

Más allá de las moléculas de la presente invención, los polinucleótidos que codifican las moléculas dirigidas a células citotóxicas de la invención están dentro del alcance de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. El término "polinucleótido" es equivalente a la expresión "ácidos nucleicos", ambos incluyen 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 triple. Los polinucleótidos descritos se dan a conocer específicamente para incluir todos los polinucleótidos capaces de codificar una molécula dirigida a células de ejemplo, por ejemplo, teniendo en cuenta la oscilación conocida a tolerar en la tercera posición de los codones de ARN, aunque codifican el mismo aminoácido que un codón de ARN diferente (ver Stothard P, Biotechniques 28: 1102-4 (2000)).

En un aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican una molécula dirigida a células citotóxica de la invención, o un complemento de la misma. Los polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más de identidad con un polipéptido que comprende una de las secuencias de aminoácidos de la proteína. La descripción también incluye polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que codifica polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa y/o un polipéptido de una molécula de la invención, o un fragmento o derivado del mismo, o el antisentido o complemento de cualquiera de tales secuencias.

Los derivados o análogos de los polinucleótidos (o polipéptidos y/o proteínas efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa) de la invención incluyen, entre otras, moléculas de polinucleótido (o polipéptido) que tienen regiones que son sustancialmente homólogas a los polinucleótidos, polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa, o proteínas de la invención, 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 se realiza mediante un programa de homología por ordenador conocido en la técnica. Un programa de ejemplo es el programa GAP (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, WI, Estados Unidos) utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith T, Waterman M, Adv. Appl. Mates. 2: 482-9 (1981). También se incluyen polinucleótidos capaces de hibridar con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas de la invención 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 además vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos dentro del alcance de la presente divulgación. Los polinucleótidos capaces de codificar la resistente, polipéptidos y/o proteínas de la invención toxina efectoras Shiga escisión por proteasa se pueden insertar 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 necesarias para apoyar la producción de polipéptidos contemplados toxina Shiga efectoras y/o proteínas de la invención dentro de cualquier célula huésped de elección o sistemas de expresión libres de células (por ejemplo pTx1 y pIVEX2.3). Los polinucleótidos específicos que comprenden los vectores de expresión para su uso con tipos específicos de células 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 ser comprados.

El término "vector de expresión", tal como se usa en el presente documento, 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 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 invención, un vector de expresión que codifica un polipéptido efector de toxinas Shiga y/o una proteína que comprende una sola cadena de polipéptido (por ejemplo, un scFv recombinado genéticamente con un polipéptido efector de la toxina Shiga) incluye al menos una unidad de expresión para la cadena polipeptídica única, mientras que una proteína que comprende, por ejemplo, dos o más cadenas de polipéptidos (por ejemplo, una cadena que comprende un  $V_L$  de dominio y una segunda cadena que comprende un  $V_H$  dominio unido a un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado) 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 multi-cadena de la invención, 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 ha 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 de control de regulación, secuencias de integración y marcadores útiles opcionales que se pueden emplear son conocidos en la técnica.

El término "célula huésped" se refiere a una célula que puede soportar 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 celulares huésped que comprenden un polinucleótido de la descripción o son capaces de producir una molécula de la invención (por ejemplo, polipéptido o proteína) pueden llevarse a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica.

#### VIII. Moléculas de la invención inmovilizadas sobre sustratos sólidos

Ciertas realizaciones de la presente invención incluyen una molécula dirigida a células de la presente invención, citotóxica, inmovilizada sobre un sustrato sólido. Los sustratos sólidos contemplados en este documento incluyen, pero no se limitan a, microperlas, nanopartículas, polímeros, materiales de matriz, microarrays, placas de microtitulación, o cualquier superficie sólida conocida en la técnica (ver por ejemplo, US 7.771.955). De acuerdo con estas realizaciones, una molécula de la presente invención puede estar unida covalente o no covalentemente a un sustrato sólido, tal como, por ejemplo, una perla, partícula, o placa, usando técnicas conocidas para el experto. Las moléculas inmovilizadas de la invención pueden ser utilizadas para aplicaciones de cribado utilizando técnicas conocidas en el sector (véase, por ejemplo Bradbury A et al, Nat Biotechnol 29: 245-54 (2011); Sutton C, Br J Pharmacol. 166: 457-75 (2012); Diamante L et al, Protein Eng Des Sel. 26: 713-24 (2013); Houlihan G et al, J Immunol Methods 405: 47-56 (2014)).

Ejemplos no limitantes de sustratos sólidos sobre los que una molécula de la invención puede inmovilizarse incluyen: microperlas, nanopartículas, polímeros, nanopolímeros, nanotubos, perlas magnéticas, perlas paramagnéticas, perlas superparamagnéticas, perlas recubiertas con estreptavidina, perlas magnéticas de fase inversa, perlas terminadas en carboxilo, perlas terminadas en hidrazina, perlas de sílice (sílice sódica) y perlas modificadas con ácido iminodiacético (IDA), perlas modificadas con aldehído, perlas activadas con epoxi, perlas modificadas con diaminodipropilamina (DADPA) (perlas con grupos de amina primaria en la superficie), perlas poliméricas biodegradables, sustratos de poliestireno, partículas de amino-poliestireno, partículas de carboxil-poliestireno, partículas de epoxi-poliestireno, partículas de dimetilamino-poliestireno, partículas de hidroxil-poliestireno, partículas de color, partículas de citometría de flujo, partículas de sulfonato-poliestireno, superficies de nitrocelulosa, membranas de nitrocelulosa reforzadas, membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), sustratos a base de poli(acrilamida), sustratos de cloruro de polivinilo, sustratos de metacrilato de polimetilo, sustratos de poli(dimetil siloxano) y fotopolímeros que contienen especies fotorreactivas (tales como radicales nitrenos, carbenos y cetilo) capaces de formar enlaces covalentes. Otros ejemplos de sustratos sólidos sobre los que una molécula de la invención puede inmovilizarse se utilizan comúnmente en sistemas de expresión molecular, tales como, por ejemplo, superficies celulares, fagos y partículas de virus.

#### IX. 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 presente invención, tal como una composición farmacéutica, para la administración a un sujeto. Por lo tanto, un dispositivo de administración que comprende una o más composiciones se puede usar para administrar a un paciente una composición de materia mediante diversos procedimientos de administración, incluyendo: inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal; administración oral; administración transdérmica; administración pulmonar o transmucosa; administración por implante, bomba osmótica, cartucho o microbomba; o mediante otros medios reconocidos por una persona de experiencia en la técnica.

También dentro del alcance de la presente divulgación están kits que comprenden una molécula dirigida a células citotóxica, polinucleótido, composición farmacéutica o composición de diagnóstico de la invención, 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 comprende al menos un reactivo adicional (por ejemplo, patrones, marcadores, y similares) o dispositivo de administración farmacéutica. 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 usa una molécula, composición, o el procedimiento relacionado de la invención, tal como se describe en el presente documento.

X. Procedimientos para usar moléculas de la invención que incluyen polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa, moléculas dirigidas a células, composiciones farmacéuticas y composiciones de diagnóstico de la invención

En general, un objeto de la invención es proporcionar agentes farmacológicamente activos, así como composiciones que comprenden los mismos, tal como se define en las reivindicaciones, que se pueden utilizar en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones, tales como ciertos tipos de cáncer, tumores, anomalías en el crecimiento, trastornos inmunitarios u otras afecciones patológicas mencionadas en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención proporciona moléculas de la invención (incluyendo moléculas dirigidas a células, composiciones farmacéuticas, y composiciones de diagnóstico) para su uso en procedimientos para la eliminación selectiva de células, para la liberación de materiales exógenos adicionales en células diana, para el marcaje de los interiores de las células diana, para la recogida de información de diagnóstico y para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones, tal como se define en las reivindicaciones.

En particular, un objeto de la presente invención 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. Por consiguiente, la presente invención proporciona usos de moléculas de la presente invención que consisten en polipéptidos o proteínas caracterizadas por secuencias de polipéptidos especificadas y composiciones farmacéuticas de los mismos. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias polipeptídicas en SEQ ID NOs: 4-61 puede utilizarse específicamente como un componente de la molécula dirigida a células utilizada en los siguientes procedimientos.

La presente invención proporciona procedimientos *in vitro* para eliminar una célula que comprende la etapa de poner en contacto la célula con una molécula dirigida a células citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. Las moléculas y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para eliminar un tipo específico de célula tras poner en contacto una célula o células con una de las composiciones reivindicadas de la materia. En ciertas realizaciones, una molécula dirigida a células, citotóxica, o composición farmacéutica de la presente invención pueden usarse para eliminar tipos específicos de células 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 molécula dirigida a células, citotóxica, o composición farmacéutica de la presente invención se pueden usar para eliminar células cancerosas en una mezcla de diferentes tipos de células. En ciertas realizaciones, las moléculas dirigidas a células, citotóxicas, y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para eliminar tipos específicos de células en una mezcla de diferentes tipos de células, tales como tejidos pretrasplante. En ciertas realizaciones, una molécula dirigida a células o composición farmacéutica de la presente invención se pueden utilizar para eliminar tipos específicos de células en una mezcla de tipos de células, tales como material de tejido preadministración con fines terapéuticos. En ciertas realizaciones, una molécula dirigida a células o composición farmacéutica de la presente invención se pueden utilizar para eliminar selectivamente células que expresan una biomolécula diana extracelular particular, tal como una biomolécula de la superficie celular. Las moléculas y composiciones farmacéuticas de la invención tienen diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, usos en el agotamiento de tipos de células no deseadas de los 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, usos 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 molécula dirigida a células citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención, sola o en combinación con otros compuestos o composiciones farmacéuticas, pueden mostrar actividad de eliminación celular potente 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 dirigirse la administración 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 celular puede limitarse 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 divulgación proporciona un procedimiento para matar a una célula en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente al menos una molécula citotóxica de la presente invención o una composición farmacéutica de la misma.

5 Ciertas realizaciones de la citotóxico, las composiciones de moléculas o farmacéuticas dirigidas a células de los mismos se pueden utilizar para matar a un cáncer y/o de células tumorales en un paciente mediante la orientación de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplado físicamente con un cáncer y/o de células tumorales. Los términos "celulares de cáncer" o "célula cancerosa" se refiere a diversas células neoplásicas que crecen y se dividen de una forma anormalmente acelerado y/o no regulada y serán evidentes para la persona experta. El término "célula tumoral" incluye tanto las células malignas y no malignas (por ejemplo, no canceroso, las células tumorales benignas, no canceroso "cáncer", células madre tumorales, células pre-malignas iniciadoras del cáncer, células iniciadoras del tumor tallo, o células tumorigénicas todo lo cual puede dar lugar a células hijas 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 puede definir como enfermedades, trastornos o condiciones que son susceptibles de tratamiento y/o prevención células neoplásicas a menudo se asocian con uno o más de los siguientes: crecimiento no regulado, falta de diferenciación, los tejidos locales invasión, la angiogénesis, y la metástasis. los cánceres y tumores (ya sea malignas o no malignas) que se componen de células cancerosas y/o células tumorales que pueden beneficiarse de los procedimientos y composiciones de la invención será evidente para la persona experta.

La presente invención se puede usar para eliminar las células madre de cáncer, que comúnmente están dividiendo lento y resistente a las terapias del cáncer, como la quimioterapia y la radiación. Por ejemplo, leucemias mieloides agudas (AML) se pueden tratar con la presente invención matando AML las células madre y/o células progenitoras AML latentes (véase, por ejemplo Shlush L et al, Blood 120: 603-12 (2012)). células madre de cáncer a menudo sobreexpresan blancos de superficie celular, tales como CD44 y CD200, que se pueden utilizar a moléculas diana terapéuticas de la presente invención (véase, por ejemplo Kawasaki B et al, Biochem Biophys Res Commun 364: 778-82 (2007); Reim . F et al, Cancer Res 69: 8058-66 (2009)).

Ciertas realizaciones de la molécula citotóxica de la invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se pueden utilizar para matar a una célula inmune (ya sea sano o maligno) en un paciente por la orientación de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplado físicamente con una célula inmune.

Ciertas realizaciones de la molécula citotóxica de la invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se pueden utilizar para matar una célula infectada en un paciente mediante la orientación de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplado físicamente con una célula infectada.

Está dentro de la presente divulgación la utilización de la molécula citotóxica de la invención, o composiciones farmacéuticas de la misma, a los efectos del 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 molécula citotóxica puede utilizarse en un procedimiento para la profilaxis del rechazo del trasplante de órganos en el que el órgano del donante se perfunde antes del trasplante con la molécula citotóxica de la invención o una composición farmacéutica de la misma a fin de purgar el órgano de células B y/o células T del donante no deseadas.

También está dentro del alcance de la presente divulgación utilizar la molécula citotóxica de la invención, o la composición farmacéutica de la misma, para los fines de purga en poblaciones de células del paciente (por ejemplo, médula ósea) de células malignas, neoplásicas o células B y/o células T no deseadas y a continuación, la reinfusión del material agotado en células B y/o células T en el paciente.

También está dentro del alcance de la presente divulgación utilizar la molécula citotóxica de la invención, o la composición farmacéutica de la misma, a los efectos del agotamiento de células B, células NK, y/o células T de una población celular donante como profilaxis contra la enfermedad del injerto contra el anfitrión, y la inducción de la tolerancia, en un paciente que va a someterse a un trasplante de médula ósea y/o células madre (véase, por ejemplo Sarantopoulos S et al, Biol Blood Marrow Transplant. 21: 16-23 (2015)).

Ciertas realizaciones de la molécula citotóxica de la invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se pueden utilizar para matar una célula infectada en un paciente mediante la orientación de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplado físicamente con una célula infectada.

Adicionalmente, la presente invención proporciona una molécula citotóxica de la invención, o una composición farmacéutica del mismo, para uso en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente. Las enfermedades contempladas, trastornos y afecciones que se pueden tratar incluyen cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, anomalías de crecimiento, trastornos del sistema inmunitario, y las infecciones microbianas. La administración de una "dosis terapéuticamente eficaz" de una molécula o composición de la invención puede resultar en una disminución de la severidad de síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de enfermedad, o una prevención de la deficiencia o discapacidad debido a la afección enfermedad.

La cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula 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.

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.

Para la administración de una composición farmacéutica de la invención, el intervalo de dosis será generalmente de aproximadamente 0,0001 a 100 miligramos (mg) por kilogramo (kg) (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.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se administrarán habitualmente 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 para una molécula o composición de la invención incluyen la administración intravenosa de 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal con la molécula o composición administrada 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.

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. Como se apreciará 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 moléculas, composiciones farmacéuticas, y composiciones de diagnóstico de la invención incluyen, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal, u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. En otras realizaciones, una composición molécula dirigida a células o farmacéutica de la invención puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una tópica, epidérmica o vía mucosa de administración, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, o por vía tópica.

Las moléculas terapéuticas 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 composición molécula, molécula dirigida a células, o farmacéutica de la presente invención se puede administrar solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Una terapia de combinación puede incluir una molécula citotóxica de la composición de la invención o farmacéutica del mismo en combinación con al menos otro agente terapéutico seleccionado en base a la paciente en particular, la enfermedad o condición a ser tratada. Ejemplos de otros tales agentes incluyen, entre otras cosas, un citotóxico, anti-cáncer o

agente quimioterapéutico, un agente anti-inflamatorio o anti-proliferativo, un agente antimicrobiano o antiviral, factores de crecimiento, citoquinas, un analgésico, una pequeña molécula terapéuticamente activo o polipéptido, un anticuerpo de cadena, un anticuerpo clásica o fragmento del mismo, o una molécula de ácido nucleico que modula una o más vías de señalización, y la terapéutica de modulación similares que pueden complementar o de otro modo ser beneficioso en un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico.

El tratamiento de un paciente con una molécula o composición farmacéutica dirige a una célula de la invención conduce preferiblemente a la muerte celular de las células diana y/o la inhibición del crecimiento de células diana. Como tales moléculas, citotóxicos de la invención, y composiciones farmacéuticas que los comprenden, serán útiles en procedimientos para tratar una variedad de trastornos patológicos en los que matar o agotamiento de las células diana puede ser beneficioso, tales como, entre otros, cánceres, tumores, anomalías en el crecimiento, trastornos del sistema inmunitario y las células infectadas. La presente invención proporciona para la supresión de la proliferación celular, y el tratamiento de trastornos de células, incluyendo neoplasia, células B hiperactivos, y las células T hiperactivas.

Las moléculas y composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para tratar o prevenir cánceres, tumores (malignos y no malignos), anomalías de crecimiento, trastornos del sistema inmunitario, y las infecciones microbianas. En un aspecto de la divulgación, el procedimiento *ex vivo* anterior puede combinarse con el uso terapéutico *in vivo* anterior para tratar o prevenir el rechazo en receptores de trasplante de médula ósea, y para el logro de la tolerancia inmunológica.

La presente divulgación proporciona para el tratamiento de tumores malignos o neoplasmas y otros cánceres asociados a células de la sangre en un sujeto mamífero, tal como un ser humano, el uso de una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula citotóxica o la composición farmacéutica de la invención.

Las moléculas y composiciones farmacéuticas de la invención tienen diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, utiliza en la eliminación de las células B no deseados y/o células T, utiliza en la modulación de la respuesta inmune para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, usos como agentes antivirales, usos como agentes antimicrobianos, y usos en purgar los tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas. Las moléculas y composiciones farmacéuticas de la presente invención son agentes comúnmente anti-neoplásicas - 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.

En ciertos aspectos de la divulgación, una molécula dirigida a células o composición farmacéutica de la presente invención se usa para tratar una enfermedad o trastorno mediado por células B, células del plasma, células T o anticuerpos, tales como por ejemplo leucemia, linfoma, mieloma, enfermedades relacionados con 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 moléculas 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 de patógenos microbiológicos, como la causada por virus, bacterias, hongos, priones, o protozoos.

Está dentro de la presente divulgación proporcionar una profilaxis o tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por las células B y/o por las células T, implicando la profilaxis o tratamiento la administración de la molécula citotóxica de la invención, o una composición farmacéutica de la misma, a un paciente para el propósito de matar 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 el trasplante de órganos, independientemente de la fuente del material trasplantado, por ejemplo, de fuentes humanas o no humanas.

Está dentro de la presente divulgación proporcionar un receptor de médula ósea para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de huésped contra injerto a través de la eliminación celular dirigida de las células B y/o células T del huésped usando una molécula dirigida a células citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención.

Las moléculas, moléculas dirigidas a células y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser para uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente, en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula, molécula dirigida a células, o composición farmacéutica de la presente invención. En ciertos aspectos de la presente divulgación, 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 de 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 cáncer de la nasofaringe, cáncer oral o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (tales como leucemia, linfoma o mieloma), cáncer del tracto renal-urinario (tal como cáncer renal y cáncer de vejiga), cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura (tal como 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 moléculas y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser para uso en un procedimiento para tratar un trastorno inmunitario que comprende la administración a un paciente, en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la molécula citotóxica o una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones de la presente invención, el trastorno inmunitario está relacionada con una inflamación asociada a una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, de Hashimoto tiroiditis, síndrome urémico hemolítico, enfermedad, lupus eritematoso sistémico, la esclerosis múltiple, la poliartritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, escleroderma, el choque séptico, el síndrome de Sjogren, colitis ulcerosa, y vasculitis relacionada con el VIH.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención es el uso de la molécula de la invención como un componente de una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento o prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario, y/o infección microbiana. Por ejemplo, trastornos del sistema inmunitario que 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 un medicamento tal en los esfuerzos para reducir el tamaño del tumor o eliminar el tumor por completo.

Ciertas moléculas citotóxicas, composiciones farmacéuticas, y composiciones de diagnóstico de la invención pueden ser utilizados en aplicaciones de neurocirugía molecular, tales como inmunolesioning y rastreo neuronal (véase, Wiley R, Lappi D, Adv Drug Deliv Rev 55: 1043-1054 (2003), para revisión). Por ejemplo, el dominio de dirección puede ser seleccionado o se deriva de diversos ligandos, tales como los neurotransmisores y neuropéptidos, que se dirigen a tipos de células neuronales específicas por receptores de la superficie neuronales, tales como un determinado receptor acoplado a proteína G circuito neuronal de unión. Del mismo modo, el dominio de dirección puede seleccionarse de o derivados de anticuerpos que se unen los receptores de superficie neuronales. Debido a que los polipéptidos efectores de la toxina Shiga pueden dirigir robustamente su propio transporte axonal retrógrado, ciertas moléculas citotóxicas de la invención pueden usarse para matar una neurona (s) que expresa la diana extracelular en un sitio de la inyección molécula citotóxica distante del cuerpo de la celda (ver Llewellyn. -SMITH I et al, J Neurosci Procedimientos 103: 83-90 (2000)). Estos neuronal tipo específico de célula de orientación moléculas citotóxicas de la invención tienen usos en investigación en neurociencias, tales como para elucidar los mecanismos de sensaciones (véase, por ejemplo Mishra S, Hoon M, Ciencia 340: 968-71 (2013)), y la creación de sistemas modelo de neurodegenerativa enfermedades, tales como el Parkinson y el Alzheimer (véase, por ejemplo Hamlin A et al., PLoS One e53472 (2013)).

Entre ciertos aspectos de la presente divulgación está un procedimiento de uso de una composición farmacéutica de molécula dirigida a células, y/o composición de diagnóstico de la invención para etiquetar o detectar los interiores de un tipo de célula, tales como, por ejemplo, tipos de células neoplásicas y/o células inmunes. Basándose en la capacidad de ciertas moléculas de la invención para entrar en tipos de células específicos y enrutarse dentro de las células a través de transporte intracelular retrógrado, los compartimientos interiores de tipos específicos de células pueden marcarse para la detección. Esto se puede realizar *in vivo* en células *in situ* dentro de un organismo, por ejemplo un paciente, o *in vitro* en células y tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

Entre ciertos aspectos de la presente divulgación está un procedimiento de utilización de una molécula dirigida a células citotóxica, composición farmacéutica y/o composición de diagnóstico de la invención para detectar la presencia de un tipo de célula para el propósito de reunir información con respecto a enfermedades, afecciones y/o trastornos. El procedimiento comprende poner en contacto una célula con una cantidad diagnósticamente suficiente de una molécula citotóxica para detectar la molécula citotóxica mediante un ensayo o una técnica de diagnóstico. La frase "cantidad diagnósticamente suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona una detección adecuada y medición precisa para fines de recopilación de información por el ensayo o técnica de diagnóstico particular 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 y 100 mg del agente promotor de la detección unida a la molécula dirigida a células por kg de sujeto por sujeto. Típicamente, la cantidad de la molécula dirigida a células de la invención usado 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 molécula citotóxica, la molécula dirigida a células, la composición farmacéutica o composición de diagnóstico de la invención administrada a un sujeto será tan baja como sea factiblemente posible.

El direccionamiento específica de tipo celular de ciertas moléculas de la invención en combinación con agentes de detección promover proporciona una manera de detectar y celdas de imagen acoplados físicamente con una

biomolécula diana extracelular de una región de unión de la molécula de la invención. Obtención de imágenes de células por medio de las moléculas y/o composiciones de diagnóstico de la invención puede llevarse a cabo *in vitro* o *in vivo* mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. 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 ex vivo utilizando muestras tomadas de un organismo. El término "muestra" se utiliza 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 el semen, y los tejidos obtenidos por procedimientos de biopsia. Por ejemplo, varios agentes de detección promoción se pueden utilizar para no invasiva imágenes de tumores *in vivo* mediante técnicas tales como resonancia magnética (MRI), procedimientos ópticos (tales como directa, fluorescente y bioluminiscente de imágenes), la tomografía por emisión de positrones (PET), emisión de fotón único tomografía computarizada (SPECT), ultrasonidos, computarizada de rayos x de tomografía, y combinaciones de lo anterior (véase, Kaur S et al, Cancer Lett. 315: 97-111 (2012), para revisión).

Entre ciertos aspectos de la presente divulgación está un procedimiento de uso de una molécula o composición farmacéutica de la invención como una composición de diagnóstico para etiquetar o detectar los interiores de tipos de células de cáncer, tumor y/o inmunes (véase, por ejemplo, Koyama Y et al. , Clin Cancer Res 13: 2936-45 (2007); Ogawa M et al, Cancer Res. 69: 1268-1272 (2009); Yang L et al, Small 5: 235-43 (2009)). Basado en la capacidad de ciertas moléculas, moléculas dirigidas a células, y las composiciones farmacéuticas de la invención para entrar en tipos de células específicos y enrutar dentro de las células a través de transporte intracelular retrógrado, los compartimientos interiores de tipos específicos de células están marcados para la detección. Este procedimiento puede realizarse *in vivo* dentro de un paciente, incluyendo en las células *in situ*, por ejemplo en un locus de la enfermedad, y/o *in vitro* en células extraídas de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

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

Las composiciones de diagnóstico de la invención pueden ser utilizadas 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 los trastornos de la enfermedad o la infección puede ayudar al pronóstico y predicción durante la toma de decisiones terapéuticas. En la recurrencia de la enfermedad, la invención puede ser utilizada para discriminar problemas locales frente a problemas sistémicos.

Las composiciones de diagnóstico de la invención pueden ser usadas para evaluar las respuestas a un agente o agentes terapéuticos, independientemente del tipo de agente terapéutico, por ejemplo, fármaco de molécula pequeña, fármaco biológico o terapia basada en células. Por ejemplo, ciertas formas de realización de los diagnósticos 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 que ya se está administrando a un paciente (ver Smith-Jones P et al, Nat Biotechnol 22: 701-6 (2004); Evans M et al, Proc Natl Acad Sci USA 108: 9578-82 (2011)).

Ciertas realizaciones del procedimiento utilizado para detectar la presencia de un tipo celular pueden utilizarse para reunir información con respecto a las enfermedades, trastornos y condiciones, tales como, por ejemplo el cáncer de hueso (tales como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), cáncer de mama, en el centro/cáncer del sistema nervioso periférico (tal como cáncer de cerebro, neurofibromatosis, o glioblastoma), cáncer gastrointestinal (tales como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (tales como los cánceres de ovario y cánceres testiculares, cáncer de glandular (por ejemplo, cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de la glándula salival, o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza-cuello (como el cáncer nasofaríngeo, cáncer oral, o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (tales como leucemia, linfoma o mieloma), cáncer del tracto renal-urinario (tales 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 (como angiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, o sarcoma sinovial), cáncer de piel (tales como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o melanoma), 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, enfermedad de síndrome urémico hemolítico, relacionada con el VIH, lupus eritematoso sistémico, trastornos linfoproliferativos, esclerosis múltiple, miastenia gravis, la neuroinflamación, la poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, la artritis psoriásica, la artritis reumatoide, escleroderma, el choque séptico, el síndrome de Sjogren, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, vasculitis, la proliferación celular, la inflamación, la activación de leucocitos, la adhesión de leucocitos, la quimiotaxis de leucocitos, la maduración de los leucocitos, la migración de leucocitos, la diferenciación neuronal, la leucemia linfoblástica aguda (ALL), T leucemia linfocítica aguda/linfoma (ALL), leucemia mielógena aguda, Leucemia mieloide aguda (AML), de células B leucemia linfocítica crónica (B-CLL), linfoma de células B prolinfocítica, linfoma de Burkitt (BL), leucemia linfocítica crónica

(CLL), leucemia mielógena crónica (CML-BP), mieloides crónicas leucemia (CML), linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas (HCL), el linfoma de Hodgkin (HL), linfoma de células B grandes intravascular, granulomatosis linfomatoide, linfoma linfoplasmacítico, linfoma MALT, linfoma de células del manto, mieloma múltiple (MM), leucemia natural killer celular, linfoma de células B nodal marginal, linfoma no hodgkiniano (NHL), leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma de efusión primaria, leucemia pro-linfocítica, 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 Waldenström.

En ciertas realizaciones, las moléculas de la invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se utilizan tanto para el diagnóstico y el tratamiento, o para el diagnóstico solo.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos de moléculas dirigidas a células selectivamente citotóxicas, comprendiendo cada una una región de polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa, derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga y una región de unión capaz de unirse a un biomolécula diana extracelular acoplada físicamente a tipos de células específicos.

## EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos demuestran ciertas realizaciones de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no tienen la intención, ni deben ser interpretados, como totalmente definitivos en cuanto a las condiciones y el alcance de esta invención, que es como se define en las reivindicaciones. 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 ejemplos a continuación describen el descubrimiento inesperado de que la alteración de un motivo de escisión por furina conservado en el extremo carboxi del fragmento A1 de toxina Shiga no disminuyó la citotoxicidad de las construcciones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga dirigida a células, a pesar de que el fragmento A1 se une covalentemente en su carboxi terminal a restos moleculares de un tamaño relativamente grande, es decir, mayor de 28 kilodaltons (kDa) de tamaño. Esto fue sorprendente porque se pensó que el proceso de intoxicación de la toxina Shiga requería la liberación del fragmento A1 de la toxina Shiga de todos los otros restos moleculares grandes, tales como, por ejemplo, el fragmento A2 de la toxina Shiga y pentámero de las subunidades B de toxina Shiga. Esto fue sorprendente porque se pensó que el proceso de intoxicación de la toxina Shiga requería la liberación del fragmento A1 de la toxina Shiga catalítico de sus subunidades de direccionamiento. Esto fue sorprendente porque se pensó que el proceso de intoxicación óptimo de toxina Shiga requería la liberación del fragmento A1 de la toxina Shiga de todos los otros restos moleculares grandes para presentar un dominio carboxi terminal hidrófobo reconocido por el sistema ERAD para retrotranslocar eficientemente fragmentos A1 liberados desde el retículo endoplásmico al citosol, donde los ribosomas de la célula huésped son catalíticamente inactivados.

Tal como se demuestra en los Ejemplos a continuación, la citotoxicidad de las moléculas dirigidas a células ejemplares que comprenden región del polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a escisión por furina a células diana fue equivalente a la citotoxicidad de las moléculas de células-targeting comprende escisión por furina sensible, polipéptido toxina Shiga efector regiones. Del mismo modo, la citotoxicidad selectiva de moléculas dirigidas a células ejemplares que comprenden un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a matar selectivamente las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de sus regiones de unión fue equivalente a la citotoxicidad de moléculas dirigidas a células escisión por furina que comprende un polipéptido sensible, toxina Shiga efector. Los, citotóxicos, moléculas dirigidas a células ejemplares de la invención con eficacia 1) entraron en las células diana; 2) enrutado su resistente escisión por furina, toxina Shiga polipéptido efector al citosol; 3) los ribosomas inactivadas; y 4) matado las células diana. Además, después de la administración a los mamíferos, las moléculas dirigidas a células ejemplares exhibidos mejorado en toxicidad *in vivo* en comparación con moléculas dirigidas a células que comprenden un tipo furina escisión sensible, polipéptido toxina Shiga efector.

Los siguientes ejemplos muestran que la interrupción de un evento conservado, escisión por furina en la toxina Shiga A Subunidades polipéptidos derivados de ejemplar, citotóxicos, moléculas dirigidas a células no afectó la citotoxicidad de estas moléculas dirigidas a células a pesar de la presencia de relativamente grande, carboxi-regiones de unión terminal, de tipo inmunoglobulina de célula-orientación. Estos relativamente grandes, restos carboxi terminales cubiertos físicamente los terminales carboxi de la A1 región polipéptido fragmento efector toxina Shiga y perjudicialmente podrían funcionar para atar los polipéptidos fragmento efectoras de toxina Shiga A1 a biomoléculas diana en la membrana del retículo endoplásmico o de otro modo la interferencia con mecanismos moleculares críticos para el enrutamiento intracelular eficaz del polipéptido fragmento efector A1 a los citosoles de células intoxicadas. Los ejemplos también muestran que las mutaciones alterar la escisión por furina de la escisión por proteasa sensible bucle, expuesto en la superficie en la toxina Shiga A polipéptidos efectores de subunidades permitieron a la ingeniería de las moléculas dirigidas a células con mejorado en tolerabilidad vivo, conservando al mismo tiempo una citotoxicidad de la toxina Shiga como potente y eficaz como moléculas dirigidas a células que comprenden de tipo salvaje, las regiones de fragmentos de la toxina Shiga A1.

**Ejemplo 1. Moléculas dirigidas a células citotóxicas que comprenden polipéptidos efectores de la subunidad A de a toxina Shiga resistente a furina(SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1a-FR::scFv-2)**

5 Se creó un polipéptido efector de la Subunidad A de toxina Shiga resistente a furina y se ensayó como un componente de moléculas dirigidas a células, que cada una comprendía además una región de unión de tipo inmunoglobulina dirigida a células. Para diseñar la resistencia a la proteasa en un polipéptido efector de la toxina Shiga, se introdujeron dos sustituciones de residuos de aminoácidos, R248A y R251A, en un polipéptido efector de la toxina Shiga derivado de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A) que comprende los aminoácidos 1- 251 de SLT-1A. Esta construcción doble mutante R248A y R251A resistente a la escisión por furina se denomina aquí como "SLT-1A-FR" (para resistente a furina SLT-1A). Se generó una segunda construcción mutante resistente a la escisión por furina, denomina aquí como "SLT-1A-FR-2", con la única sustitución de residuo R248A. Una tercera construcción mutante resistente a la escisión por furina, denominada aquí como "SLT-1A-FR-3", comprende una única sustitución de residuo R251A. La mutación del sitio de escisión por la proteasa furina mínima R-x-x-R en el núcleo de la región motivo de consenso de furina 240-256 se predijo para alterar la sensibilidad de esta región a la proteólisis por la furina y otras proteasas, tales como, por ejemplo, convertasas proproteína y promiscua proteasas. Se utilizó el polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-FR que comprende la alteración R251A/R248A del sitio de escisión por furina para crear moléculas dirigidas a células de ejemplo.

20 El citotóxico a modo de ejemplo, las moléculas dirigidas a células SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 se construye de tal manera que cada uno compuesto una toxina Shiga catalítica Una región polipéptido Subunidad efector que comprende una escisión por furina alterado sitio y una región de unión dirige a una célula. En SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2, el polipéptido efector de la toxina Shiga se fusionó a una región de unión relativamente grande, carboxi terminal. SLT-1A-FR:: scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 fueron producidos en un sistema bacteriano y se purificaron por cromatografía en columna. Las regiones de unión a scFv-1 y scFv-2 eran fragmentos variables de cadena única que cada sujeto con alta afinidad a una cierta superficie de la célula, el objetivo de biomolécula acoplada físicamente a la superficie de ciertas células cancerosas humanas así como a ciertas células cancerosas humanas.

30 Ensayo de la sensibilidad de proteólisis por furina de moléculas dirigidas a una célula de ejemplo que comprende SLT-1A-FR

La sensibilidad de escisión por furina de polipéptidos efectores de la toxina Shiga después de la mutación de la región sensible a la escisión por proteasa 240-256 con el fin de alterar la escisión por furina se probó en el contexto molecular de las proteínas de fusión que comprenden región de unión dirigida a una célula carboxi terminal. Para evaluar la capacidad de furina para escindir SLT-1A-FR:: scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2, las muestras de proteínas purificadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) se incubaron con furina (New England Biolabs, Ipswich, MA, Estados Unidos) en 0,5 unidades de actividad de furina (U) por microgramo (ug) de proteína de la muestra en tampón de escisión por furina (100 milimolar (mM) HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetasulfónico), pH 7, CaCl<sub>2</sub> 1 mM) durante 25-30 horas (h) a 30 o 37 grados Celsius (° C). Las muestras de control se incubaron sin furina a 4, 30, o 37°C en el mismo tampón. Las diversas muestras de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS), en condiciones desnaturizantes y se tiñeron con Coomassie (Figuras 2 y 3).

45 Las figuras 2 y 3 muestran imágenes de los geles con los carriles numerados y contienen leyendas de las figuras que indican en qué carril se cargaron con la muestra de la que la proteína: o una proteína específica de célula que comprende una de tipo salvaje, Polipéptido efector de la toxina Shiga (SLT-1A-WT) o un sitio de escisión por furina interrumpida, toxina Shiga polipéptido efector (SLT-1A-FR o SLT-1A-FR-2). Los carriles marcados "L" mostrar el patrón de migración de una escalera de peso molecular de proteína junto con el tamaño aproximado de las bandas de proteínas escalera individuales en kDa para su uso como una referencia de peso molecular interno que permite la estimación de los tamaños de las proteínas en los carriles numerados . Las leyendas de las figuras indican las condiciones de pre-tratamiento de las muestras de proteína con la temperatura en grados Celsius (° C), la duración, y si cualquier furina se añadió por que denota la cantidad de unidades de actividad furina por microgramo (marcado como "U // g furina ") o 'no furina' para cero unidades.

55 Las figuras 2 y 3 muestran que SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 eran resistentes a la escisión por furina humana. Las proteínas dirigida por células ensayados en este ensayo fueron ambos sobre 55-57 kDa en tamaño y comprenden un polipéptido efector de la toxina Shiga de aproximadamente 28 kDa (idénticos en tamaño, tanto para SLT-1A-WT y SLT-1A-FR) unido a una enlazador carboxi terminal y la región de unión que reunidos eran 28-29 kDa en tamaño. Si la escisión de furina se había producido en la superficie expuesta, extendida bucle 242-251 de SLT-1A, a continuación, el resultado esperado sería de dos bandas de proteínas con pesos moleculares iguales cerca de alrededor de 28 kDa cada una. Si la escisión de furina se produce precisamente en el enlace peptídico carboxi de la arginina en la posición 251 del andamio WT en SLT-1A-WT::scFv-1 o SLT-1A-WT::scFv-2, a continuación, las dos bandas de proteína resultante debe tener el peso molecular de 27,5 kDa para SLT-1A (ya sea WT o FR) y una segunda banda de 28,8 kDa para SLT-1A-FR::scFv-1 o 27,6 kDa para SLT-1A-FR::scFv-2.

La Figura 2 muestra que SLT-1A-FR::scFv-1 no fue proteolizada *in vitro* por la furina humana en este ensayo en las condiciones ensayadas. Como se esperaba, la proteína de control SLT-1A-WT::scFv-1, que comprendía un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje, se escindió por la furina humana (Figura 2); sin embargo, SLT-1A-FR::scFv-1 fue resistente (comparar los carriles 3 y 6 en la Figura 2).

SLT-1A-FR::scFv-2 también era resistente a la furina escisión en este ensayo a varias temperaturas diferentes (Figura 3). La Figura 3 muestra que SLT-1A-FR::scFv-2 no se proteolizaba *in vitro* por la furina humana en este ensayo en las condiciones ensayadas, tal como a temperaturas que van de 4 ° a 37 ° C.

Además, una proteína de fusión dirigida a células SLT-1A-FR::scFv-2 era resistente a la escisión por furina en este ensayo a 4 ° C.

El uso de este ensayo de escisión por furina *in vitro*, no se observó proteólisis por furina de proteínas de fusión dirigidas a células en ningún sitio de la escisión por furina además de 248-251 en la región de polipéptido efector de la toxina Shiga, tal como, por ejemplo, en el componente de SLT-1A en el sitio de escisión por furina nativo posicionado en la región de 220-223.

Por lo tanto, la mutación del sitio de escisión por la proteasa furina mínima R-x-x-R en el núcleo de la región motivo de consenso de furina alteró la sensibilidad de esta región a la proteólisis por la furina humana *in vitro*.

#### Ensayo de la actividad inhibidora de ribosomas de las moléculas dirigidas a células que comprenden SLT-1A-FR

Las moléculas de la presente invención, todos comprenden un dominio catalítico deriva de al menos una toxina Shiga A subunidad, tal como se define en las reivindicaciones. La actividad enzimática de la furina resistente-escisión, toxina Shiga polipéptido efector SLT-1A-FR se ensayó usando un ensayo *in vitro* de inhibición en ribosoma. La actividad de inactivación de ribosomas de SLT-1A-FR se probó en el contexto molecular de una región de unión carboxi terminal, dirigido a las células usando SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 se determinaron con un Transcripción/Kit de traducción libre de células, *in vitro*, ensayo de la traducción de proteínas usando el TNT® Quick Coupled (L1170 Promega Madison, WI, US). El kit incluye ADN de luciferasa T7 Control (L4821 Promega Madison, WI, Estados Unidos) y Mix Master TNT® rápida. La reacción actividad ribosoma se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una serie de diluciones de 10 veces de la molécula dirigida a células a ensayar (proteínas que comprenden cualquiera de SLT-1A-WT o SLT-1A-FR) se prepararon en un tampón apropiado y una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT idénticas fueron creados para cada dilución. Cada muestra en la serie de dilución se combinó con cada uno de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control de luciferasa de T7. Las muestras de ensayo se incubaron durante 1,5 horas a 30 ° C. Después de la incubación, se añadieron de ensayo de luciferasa Reactivo (Catálogo # E1483, Promega Corp., Madison, WI, Estados Unidos) a todas las muestras de prueba y la cantidad de traducción de la proteína luciferasa se midió 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. El uso de software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, Estados Unidos), el medio de concentración inhibidora máxima (IC<sub>50</sub>) valor se calculó para cada muestra usando la función de software Prism de log (inhibidor) vs. respuesta (tres parámetros)  $[Y = \text{Bottom} + ((\text{Top}-\text{Bottom})/(1 + 10^{-X \cdot \text{Log}(IC_{50})}))]$  bajo el título de dosis-respuesta de inhibición.

El IC<sub>50</sub> para cada proteína que comprende un polipéptido efector de toxina resistente Shiga escisión por furina (SLT-1A-FR) región y una de tipo salvaje (WT) proteína de control a partir de uno o más experimentos se calculó y se muestra en la Tabla 1. Las construcciones que comprende la escisión por furina resistente SLT-1A-FR exhibió inhibición ribosoma potente que era comparable a los controles de tipo salvaje, como un SLT-1 fragmento A1 de tipo salvaje (SLT-1A1-WT) (Tabla 1). Tanto exhibido actividad de inactivación de ribosomas SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 *in vitro* comparable a una de tipo salvaje, fragmento A1 toxina Shiga.

**Tabla 1.** El polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a a escisión por furina exhibió una inhibición equivalente de ribosomas *in vitro* a un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por furina

Polipéptido	Inhibición de ribosomas IC <sub>50</sub> (pM)
SLT-1A1-WT solo	158
SLT-1A-WT::scFv-1	107
SLT-1A-FR::scFv-1	131
SLT-1A-WT::scFv-2	101
SLT-1A-FR::scFv-2	187

Ensayo de la citotoxicidad de los moléculas dirigidas a células de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2

La citotoxicidad de las moléculas dirigidas a células ejemplares que comprenden resistente la escisión por proteasa, toxina Shiga polipéptido efector SLT-1A-FR se determinó usando ensayos de muerte celular conocidos para el experto. citotoxicidad específica se determinó mediante la comparación de la citotoxicidad de las moléculas dirigidas a células ejemplares hacia las células que expresan diana frente la citotoxicidad de una, de tipo salvaje no directo, Shiga control de la toxina efector (SLT-1A-WT). citotoxicidad selectiva se determinó mediante la comparación de la citotoxicidad hacia células diana frente a células que no expresan una biomolécula diana de región de unión de la molécula dirigida a células que expresa. Se seleccionaron las células que expresaron una cantidad significativa de una biomolécula diana extracelular de scFv-1 o scFv-2 al menos una superficie celular, es decir, células que eran (líneas celulares positivas-región de unión biomolécula diana A, B, C, y D fueron positivos para el objetivo de scFv-1, y las líneas celulares e, F y G fueron positivos para el blanco de scFv-2). Se seleccionaron las células que no expresan una cantidad significativa de cualquier biomoléculas diana extracelulares de scFv-1 en cualquier superficie celular y/o cualquier biomoléculas diana extracelulares de scFv-2 en cualquier superficie celular, es decir, células que eran biomolécula diana negativo para cualquier objetivo de una o ambas de las regiones de unión de scFv-1 y scFv-2.

La citotoxicidad de proteínas dirigida por células casi idénticas que comprenden o bien un tipo salvaje SLT-1A (SLT-1A-WT) o resistentes escisión por furina, Polipéptido efector de la toxina Shiga (SLT-1A-FR) se compararon directamente para aislar cualquier diferencia en citotoxicidad causada por las dos mutaciones puntuales que proporcionaron resistencia escisión por furina. Se esperaba que la citotoxicidad de moléculas dirigidas a células que comprenden un SLT-1A-FR cuyo extremo carboxi terminal estaba cubierta por una relativamente grande resto, se reduciría en comparación con moléculas dirigidas a células que comprenden un SLT-1A-WT, que puede ser liberado de un resto carboxi terminal por escisión proteolítica, particularmente por la furina endoproteasa (ver Lea N et al, Microbiología 145: 999-1004 (1999)).

Las citotoxicidades, citotoxicidades específicas, y citotoxicidades relativos de las moléculas dirigidas a células ejemplares SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 se compararon con moléculas dirigidas a células que comprenden de tipo salvaje, Shiga polipéptidos toxina efectoras.

Ciertas células de tumores humanos (incluyendo células de las líneas celulares AG) se sembraron ( $2 \times 10^3$  células por pocillo para las células adherentes, se sembraron el día antes de la adición de proteínas o  $7,5 \times 10^3$  células por pocillo para las células en suspensión, sembraron el mismo día como la adición de proteína) en un medio de 20 microlitros (l) el cultivo de células en placas de 384 pocillos. Una serie de diluciones de 10 veces de las moléculas dirigidas a células a ensayar fue preparado en un tampón apropiado, y 5! L de las diluciones o tampón de control se añadieron a las células. Los pocillos de control que contienen sólo medio de cultivo celular se utilizaron para la corrección de la línea base. Las muestras de células se incubaron con las moléculas dirigidas a células o simplemente tampón durante 3 días a  $37^\circ \text{C}$  y en una atmósfera de dióxido de carbono al 5 por ciento ( $\text{CO}_2$ ). En ciertos experimentos, las muestras de células se incubaron con las moléculas dirigidas a células o simplemente tampón durante 1 hora o 2 horas. Entonces moléculas uninternalized, dirigidas a células se lavaron lejos mediante lavados con tampón. La supervivencia de las células o porcentaje de viabilidad total se determina utilizando una lectura luminiscente usando el Cell CellTiter-Glo® luminiscente ensayo de viabilidad (Catálogo # G7573, Promega Corp., Madison, WI, Estados Unidos) según las instrucciones del fabricante.

El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación:  $(\text{Test RLU} - \text{medio de medios RLU}) / (\text{Promedio de células RLU} - \text{medio de medios RLU}) * 100$ . concentración polipéptido Log frente a porcentaje de viabilidad se representó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, Estados Unidos) y log (inhibidor) versus análisis de respuesta (3 parámetros) se utilizaron para determinar la concentración media máxima citotóxico ( $\text{CD}_{50}$ ) de valor para las proteínas ensayadas. El  $\text{CD}_{50}$  para cada proteína específica de célula que comprende una proteasa resistente-escisión, se calcularon toxina Shiga polipéptido efector o un control de tipo salvaje, polipéptido toxina Shiga efector.

La citotoxicidad de SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 hacia múltiples, que expresan la diana, las líneas de células tumorales humanas se muestran en la Tabla 2 como valores de citotoxicidad media-máxima ( $\text{CD}_{50}$ ) en la concentración de proteína específica por células en nanomolar (nM). Sorprendentemente, las proteínas dirigida por células que comprenden SLT-1A-WT y SLT-1AFR tanto muestran citotoxicidades similares (Figuras 4-5; Tabla 2) en lugar de una notable reducción en la citotoxicidad para las proteínas dirigida por células que comprenden SLT-1AFR espera que sea resultado cada vez que el fragmento de toxina Shiga A1 no puede ser liberado de manera eficiente de todos los otros restos, tales como, por ejemplo, una célula-focalización, región de unión y un fragmento de 4,5 kDa A2 (ver Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al, J Biol Chem 270: 10817-21 (1995); magra et al, Microbiología 145: 999 a 1004 (1999); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

Tabla 2. El polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por furina mostró una citotoxicidad equivalente a un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje escindible por furina

línea celular positiva diana	Citotoxicidad $\text{CD}_{50}$ (nM)
------------------------------	-------------------------------------

región de unión	diana	SLT-1A-WT solo	SLT-1A-WT::scFv-1	SLT-1A-FR::scFv-1	SLT-1A-WT::scFv-2	SLT-1A-FR::scFv-2
A	scFv-1	905,0	0,24	0,29	N/T	N/T
B	scFv-1	1800,0	0,47	0,29	N/T	N/T
C	scFv-1	37,0	0,22	0,41	N/T	N/T
D	scFv-1	4740,0	0,55	0,37	N/T	N/T
E 2	scFv-	11050,0	N/T	N/T	0,920	1,30
F 2	scFv-	32200,0	N/T	N/T	16,10	13,60
G	scFv-2	506,0	N/T	N/T	0,120	0,240

"N/T" indica no ensayado

Los CD<sub>50</sub> valores para las proteínas dirigida por células que comprenden SLT-1A-FR fueron comparables a los CD<sub>50</sub> valores para las proteínas dirigida por células que comprenden SLT-1A-WT (Tabla 2). Proteínas de la célula-dirigida que comprende SLT-1A-WT y SLT-1A-FR tanto potentemente matado diana que expresa células, pero no mató a porcentajes comparables de células negativas de destino en las mismas dosis (CD<sub>50</sub> valores para células negativas diana fueron poco informativo para estos datos como una curva exacta no se pudo generar cuando no había una disminución considerable en la viabilidad celular a las concentraciones más altas ensayadas). Los resultados resumidos en la Tabla 2 muestran la citotoxicidad comparable de SLT-1A-FR y SLT-1A-WT como componentes de moléculas dirigidas a células. Tanto SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 eran tan citotóxico como moléculas dirigidas a células relacionadas que comprenden la escisión por furina sensible, de tipo silvestre, la toxina Shiga regiones fragmento A1. Un ejemplo de la citotoxicidad específica de proteínas que comprenden un resistente a escisión por proteasa, Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-FR se muestra gráficamente: citotoxicidad fue dirigida a diana que expresan, las células tumorales humanas (Figura 4), pero no las células diana tumorales negativos, humanos (Figura 5).

Ensayo de la tolerabilidad in vivo de los ejemplos de las moléculas dirigidas a células SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 usando animales de laboratorio

La tolerabilidad fue probado para diferentes dosificaciones de los citotóxicos, moléculas ejemplares, dirigidas a células SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2, cada uno de los cuales comprende un resistente escisión por furina, toxina Shiga A Subunidad región polipéptido efector. Se utilizaron ratones para determinar el grado en que se toleraron efectos adversos manifiestos a diversas dosis de moléculas dirigidas a células ejemplares. tolerabilidad terapéutica se determinó usando hallazgo dosis murino dirigido a la medición de las dosis máximas toleradas de informar a una dosis de partida para los estudios de eficacia *in vivo*. Se realizaron los estudios de tolerabilidad en Charles River Laboratories (Charles River Laboratories International, Inc., Morrisville, NC, Estados Unidos) en cuatro estudios separados descritos en la Tabla 3. Para cada estudio, CB-17 ratones SCID hembra con deficiencia inmune combinada severa (SCID) se clasificaron en grupos con peso corporal medio similar. agentes de ensayo o vehículo de control se administraron a ratones en dosis que van de 0,25 a 5,00 miligramos por kilogramo de peso corporal por inyección (mg/kg/inj), y las inyecciones se administraron tres veces por semana para una o dos semanas. El peso corporal y los signos clínicos fueron monitoreados durante todo el estudio. Los resultados de los estudios de tolerabilidad *in vivo* utilizando animales de laboratorio se resumen en la Tabla 3. Tabla 3 indica el número de ratones por grupo, la muestra se administra, la dosis de inyección, la dosis acumulativa en mg por kg por ratón (mg/kg/ratón), el número de muertes relacionadas con el tratamiento observado (muerto), y el día promedio de muerte por grupo.

Tabla 3. Los estudios de tolerabilidad en murinos demostraron que las moléculas dirigidas a células de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 fueron bien toleradas *in vivo* a dosis comprendidas entre 0,25-2,50 mg/kg/inj

Estudio	Muestra	Dosis (mg/kg/inj)	Dosis	Dosis acumulada (mg/kg/ratón)	Ratones por grupo	Muertes	Día promedio de muerte por grupo
#1	Vehículo de control	0,00	3	0,00	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio
	SLT-1A-WT::scFv-1	125	3	3,75	4	4	8,5
	SLT-1A-WT::scFv-1	2,50	3	7,50	4	4	7,3
#2	SLT-1A-WT::scFv-1	125	3	3,75	5	5	7,4
	SLT-1A-	2,50	2	5,00	5	5	5,2

	WT::scFv-1						
	SLT-1A-WT::scFv-1	5,00	2	10,00	5	5	4,4
#3	Vehículo de control	0,00	3	0,00	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio
	SLT-1A-FR::scFv-1	0,25	3	0,75	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio
	SLT-1A-FR::scFv-1	125	3	3,75	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio
	SLT-1A-FR::scFv-1	2,50	3	7,5	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio
#4	Vehículo de control	0,00	6	0,00	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio
	SLT-1A-FR::scFv-2	0,25	6	1,50	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio
	SLT-1A-FR::scFv-2	1,00	6	6,00	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio
	SLT-1A-FR::scFv-2	2,00	6	12,00	4	0	todos vivieron hasta el final del estudio

En el estudio # 1, la molécula que se dirige a células SLT-1A-WT::scFv-1 se analizó junto con un vehículo de control. Los ratones fueron dosificados en los días de estudio 1, 3 y 5 con el vehículo de control, 1,25, o 2,50 mg/kg/inj de SLT-1A-WT::scFv-1. En el estudio 1, todos los ratones tratados con SLT-1A-WT::scFv-1 tuvieron una muerte relacionada con el tratamiento comenzando dos días después de la tercera dosis. En el estudio # 1, los ratones del grupo administrados con 1,25 mg/kg/inj de SLT-1A::WT-scFv-1 murieron los días de estudio 7, 8, 9 y 10 (un ratón por día) y los ratones del grupo administrados con 2,50 mg/kg/inj de SLT-1A-WT::scFv-1 murieron el día 7 (tres ratones) o el día 8 (un ratón). Todos los ratones en el grupo administrado con el vehículo de control sobrevivieron hasta el final del estudio.

En el estudio # 2, a los ratones se les administró SLT-1A-WT::scFv-1 como en el estudio # 1, pero con una dosis máxima mayor de 5,00 mg/kg/inj. En el estudio # 2, se produjeron resultados similares para ratones administrados con SLT-1A-WT::scFv-1 como en el estudio # 1; sin embargo, en el estudio # 2, los ratones en los dos grupos de dosis más altas solamente recibieron dos inyecciones debido a las muertes relacionadas con el tratamiento de los ratones en estos grupos. La Figura 6 muestra una comparación de la supervivencia de los ratones de un grupo administrado con 2,50 mg/kg/inj de SLT-1A-FR::scFv-1 (estudio 2 #) en comparación con ratones administrados con SLT-1A-WT::scFv 1 (estudio # 1) usando gráficos de Kaplan-Meier.

En el estudio 3, los ratones se administraron con un control de vehículo o la molécula dirigida a célula de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-1 similar al régimen de dosificación para el estudio # 1 pero con una dosis más baja de 0,25 mg/kg/inj. Los ratones fueron dosificados en los días de estudio 1, 3 y 5 con 0,25, 1,25, o 2,50 mg/kg/inj de SLT-1A-FR::scFv-1. Todos los ratones administrados con SLT-1A-FR::scFv-1 sobrevivieron hasta el final del estudio 3. Se

observó una disminución dependiente de la dosis en el peso corporal; sin embargo, una dosis máxima tolerada no se observó para SLT-1A-FR::scFv-1 en el estudio # 3. El grupo de dosificación más alta probada (administrado con 2,50 mg/kg/iny de SLT-1A-FR::scFv-1) tuvo un nadir de solamente pérdida de peso corporal del 13,1%. Estos resultados demuestran que SLT-1A-FR::scFv-1 fue bien tolerada *in vivo* a dosis de repetición que van desde 0,25 a 2,50 mg/kg/iny. Estos resultados también demuestran que SLT-1A-FR::scFv-1 fue mejor tolerada que SLT-1A-WT::scFv-1 en las condiciones ensayadas.

En el estudio 4, los ratones se administraron con un control de vehículo o molécula dirigida a célula de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2 a las 0,25, 1,00, o 2,00 mg/kg/inyección tres veces a la semana durante dos semanas (seis en total dosis). Todos los ratones administrados con SLT-1A-FR::scFv-2 sobrevivieron hasta el final del estudio # 4 y no hubo observaciones clínicas adversas durante el transcurso del estudio. El estudio # 4 se extendió hasta el día 32, y se observó que el peso corporal medio estaba por encima de 80% del peso de partida para todos los grupos que comprenden ratones administrados con SLT-1A-FR::scFv-2. Estos resultados demuestran que SLT-1A-FR::scFv-2 fue bien tolerada *in vivo* a dosis de repetición que van desde 0,25 a 2,00 mg/kg/iny.

En comparación con los resultados de tolerabilidad para moléculas dirigidas a células que comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga sensible a la proteasa de tipo salvaje, (estudios # 1 y # 2), las moléculas dirigidas a células de ejemplo que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por furina, exhibieron una tolerabilidad mejorada (estudios # 3 y # 4) en dosis que implican dosis repetidas que oscilan entre 0,25 y 2,50 mg/kg/iny.

La mejora en la tolerabilidad vivo observada para estas dos moléculas dirigidas a células de ejemplo de la invención sugiere que dosis mucho más altas de las moléculas citotóxicas de la invención se pueden administrar de manera segura a mamíferos en comparación con las moléculas parentales que comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga sensible a la escisión por furina.

A pesar de la retención de citotoxicidad equivalente a moléculas dirigidas a células casi idénticas que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje, las moléculas dirigidas a células de ejemplo que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por furina, exhibieron mamíferos con tolerabilidad mejorada, es decir, perfiles de toxicidad mejorado debido a una reducción en efectos perjudiciales. Los perfiles de toxicidad mejorados pueden ser debido a una reducción de la toxicidad no específica relacionada con la resistencia a la proteasa generalmente mejorada de las moléculas. Estos resultados también sugieren que la alteración del motivo de escisión por furina podría conferir una mayor estabilidad para toda la molécula dirigida a células. Además, la resistencia de una molécula a la proteólisis podría mejorar sus perfiles farmacocinéticos de administración a un organismo.

#### Ensayo de la citotoxicidad selectiva y la eficacia de las moléculas dirigidas a células de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2 *in vivo* utilizando modelos animales

Se utilizó un modelo de xenoinjerto diseminado para los tumores humanos para determinar la eficacia *in vivo* de la molécula dirigida a una célula citotóxica de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2 en ratones portadores de tumor humano. Las células tumorales humanas que expresan constitutivamente luciferasa y muestran expresión en la superficie celular de la diana de scFv-2 se utilizaron en este modelo de xenoinjerto.

En día 0 del estudio, los ratones CB.17 SCID con deficiencia inmune combinada severa (SCID) se expusieron por vía intravenosa con  $2,5 \times 10^6$  células tumorales hTum-Luc (Molecular Imaging, Ann Arbor, MI, Estados Unidos) en 200 microlitros (ul) de PBS. Una imagen bioluminiscente confirmatorio (BLI) fue tomada 5 minutos después de la inyección de células, y los ratones se dividieron en cuatro grupos de diez ratones cada uno (10 ratones). En los días 0 (1 hora después del implante), 2, 4, 7, 9, y 11 después de la estimulación de células tumorales, los ratones de los cuatro grupos recibieron por administración intraperitoneal el control del vehículo (0 mg/kg/iny) o SLT-1A-FR::scFv-2 a dosis de 0,05, 0,50, o 2,00 mg/kg/iny. La bioluminiscencia se midió en los días 14, 18 y 21 utilizando un sistema de imagen óptica Caliper IVIS 50 (Perkin Elmer, Waltham, MA, Estados Unidos).

La molécula dirigida a células citotóxica de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2 redujo la carga tumoral humana en los ratones en todos los niveles de dosificación. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 7 y en la Tabla 4. En este estudio, el tamaño de la muestra (n) fue de 10 ratones por grupo para los cuatro grupos. La Figura 7 muestra la carga tumoral como se ensayó mediante bioluminiscencia por ratón individual con el tiempo basado en la expresión del informador de luciferasa de las células tumorales humanas. Un ratón individual está representado por cada símbolo representado en el gráfico, es decir, triángulo abierto, triángulo relleno, círculo abierto, o cuadrado relleno. El eje Y es la señal de bioluminiscencia total de un ratón individual, que representa la carga tumoral, en millones de fotones por segundo (fotones/seg), y el eje X es la dosis de inyección que varió de 0 a 2 miligramos de SLT 1A-FR::scFv-2 por kilogramo de masa corporal por inyección. La Tabla 4 informa de la media de BLI y el error estándar de la media (SEM) entre los ratones en cada grupo a diferentes puntos de tiempo (día de estudio 14, 18, 21, y 28).

**Tabla 4.** El estudio de xenoinjertos murinos demostró que la molécula citotóxica de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2 fue

eficaz *in vivo*

Día	Vehículo de control		0,05 mg de SLT-1A-FR::scFv-2 /kg/inj		0,50 mg de SLT-1A-FR::scFv-2 /kg/inj		2,00 mg de SLT-1A-FR::scFv-2 /kg/inj	
	BLI promedio	SEM	BLI promedio	SEM	BLI promedio	SEM	BLI promedio	SEM
14	235	28	24	7	1,02	0,05	1,07	0,07
18	1900	201	251	80	1,36	0,18	0,90	0,04
21	5850	658	744	296	3,47	1,03	1,09	0,10
28	23700	2310	6960	1670	99,30	38,0	4,13	2,98

5 Estos resultados muestran que SLT-1A-FR::scFv-2 fue capaz de reducir significativamente la carga de tumor humano en ratones SCID estimulados con células tumorales humanas. Todos los grupos que comprendían ratones administrados con la molécula dirigida a célula de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2 mostró significativamente menos bioluminiscencia total en comparación con el control de vehículo (Figura 7 y Tabla 4). Este efecto se observó en los ratones a dosis administradas de SLT-1A-FR::scFv-2 comprendidas entre 0,05 y 2,00 mg/kg/inj (Figura 7 y Tabla 4). El efecto de inhibición del tumor observado fue dependiente de la dosis porque los ratones administrados con 10 0,05 mg/kg/inj de SLT-1A-FR::scFv-2 mostraron algo de crecimiento del tumor medido por BLI, mientras que los ratones administrados ya sea con 0,50 o 2,00 mg/kg/inj de SLT-1A-FR::scFv-2 no mostraron crecimiento del tumor (Tabla 4, Figura 7).

15 Estos resultados demuestran que la molécula dirigida a célula de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2 era 1) eficaz para inhibir el crecimiento del tumor *in vivo* además de exhibir 2) citotoxicidad equivalente a moléculas dirigidas a células que comprenden SLT-1A-WT sensible a la escisión por furina; y 3) la mejora de la tolerabilidad en dosis más altas en comparación con una molécula dirigida a una célula casi idéntica que comprende SLT-1A-WT.

#### 20 Resumen

Las moléculas dirigidas a células de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2, que comprendía las mutaciones en el motivo de escisión por furina mínimo R/Y-x-x-R, no se proteolizaron por furina humana, pero mostraron citotoxicidades específicas comparables a las proteínas dirigida a células que comprenden una región de a subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje. La molécula dirigida a células de ejemplo SLT-1A-FR::scFv-2 inhibe 25 eficazmente el crecimiento de tumor humano en un modelo de mamífero. Además, SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-FR::scFv-2 ambos mostraron una mejora en la tolerabilidad en comparación con las moléculas parentales que comprenden una región de la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje.

30 Las propiedades de SLT-1A-FR::scFv-1, SLT-1A-FR::scFv-2, y SLT-1A-FR-2::scFv-2, cada una, que comprende polipéptidos efectores de la toxina Shiga que comprende mutaciones de alteración de escisión por furina (R248A y/o R251A), sugieren otras alteraciones del motivo de escisión por furina en el bucle expuesto en la superficie conservado en subunidades A de toxina Shiga pueden proporcionar las mismas propiedades, tales como, por ejemplo, la citotoxicidad equivalente a moléculas que comprenden regiones de subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje y la mejora de los perfiles de toxicidad *in vivo*.

35 Las mutaciones similares a R248A y R251A en moléculas dirigidas a células que comprenden polipéptidos efectores de subunidad A de toxina Shiga pueden proporcionar estructura y función similar. Por ejemplo, cualquier mutación que perturba el motivo de consenso de escisión por furina conservado S-R/Y-x-x-R en subunidades A de toxina Shiga resultará en la resistencia a la escisión por furina, pero sin perturbar la citotoxicidad. En particular, las sustituciones de residuos de aminoácido de arginina a cualquier residuo de aminoácido no básico que carece de una carga positiva, tal como, por ejemplo, A, G, P, S, T, D, E, Q, N, C, I, L, M, V, F, W, e Y, pueden utilizarse para crear un motivo de escisión por furina alterado de un polipéptido efector de la toxina Shiga de una molécula de la presente invención. Del mismo modo, los truncamientos de la subunidad A de la toxina Shiga y las deleciones internas dentro 40 del motivo de escisión por furina que perturban el motivo de escisión por furina mínimo R/Y-x-x-R pueden usarse para crear los polipéptidos efectores de la toxina Shiga con estructura y función similar.

En resumen, pueden crearse moléculas citotóxicas usando polipéptidos derivados de subunidad A de toxina Shiga resistente de la escisión por furina, y restos proximales carboxi terminal de más de 28 kDa sin ninguna reducción en la citotoxicidad. Este es un descubrimiento sorprendente, ya que las toxinas Shiga requieren procesamiento proteolítico en este sitio de escisión por furina en los compartimentos subcelulares apropiados para la citotoxicidad óptima (véase, por ejemplo Garred Ø et al, Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred Ø et al., J Biol Chem 270: 10817-21 (1995); LeaN et al, Microbiology 145: 999 a 1004 (1999); Kurmanova A et al, Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

55 **Ejemplo 2. Molécula dirigida a células citotóxica que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión carboxi terminal específica a CD20 (SLT-1A-FR unido con αCD20)**

En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga derivado de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A) resistente a la escisión por proteasa. Un  $\alpha$ CD20-antígeno región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de un dominio de tipo inmunoglobulina que reconoce CD20 humano (véase, por ejemplo Haisma H et al, Blood 92:.. 184-90 (1999); Geng S et al, Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006); Olafesn T et al, Protein Eng Des Sel. 23: 243-9 (2010)), que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a un parte extracelular de CD20. CD20 se expresa en varios tipos de células cancerosas, tales como células de linfoma de células B, células de leucemia de células pilosas, células de leucemia linfocítica crónica de células B, y células de melanoma. Además, CD20 es una diana atractiva para la terapéutica para el tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunes, trastornos y afecciones que implican células B hiperactiva.

#### Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20"

La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ CD20 y un polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa, se unen entre sí para formar una molécula dirigida a células citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión antígeno  $\alpha$ CD20 SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20 (véase, por ejemplo, SEQ ID NOs: 50, 51, 52, y 53). La expresión de la molécula citotóxica SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20 se logra usando sistemas de traducción de la proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

#### Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20"

Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para las células CD20 + y células CD20- se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. Utilizando Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos), el  $B_{max}$  y  $K_D$  se calculan utilizando la función de software Prism de un sitio de unión de  $[Y = B_{max} * X / (K_D + X)]$  bajo el las partidas de unión a saturación.  $B_{max}$  es la unión específica máxima reportada en MFI.  $K_D$  es la constante de unión en equilibrio, informó en nM. El  $B_{max}$  para SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20 a las células CD20 + se mide para ser aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una  $K_D$  dentro del intervalo de 0,01-100 nanomolar (nM), mientras que no hay ninguna unión significativa a células CD20- en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la molécula citotóxica SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20 se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitor de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El IC<sub>50</sub> de SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20 en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

#### La determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20" usando un ensayo de eliminación celular de CD20+

Las características de citotoxicidad de SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20 se determinan por el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células CD20 +. Además, las características de citotoxicidad selectivas de SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20 se determinan por el mismo ensayo general de célula-kill usando CD20- células como una comparación con las células CD20 +. El CD<sub>50</sub> de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células CD20 +, dependiendo de la línea celular. El CD<sub>50</sub> de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) para células que no expresan CD20 en una superficie celular, en comparación con células que expresan CD20 en una superficie celular.

#### Determinación de los efectos *in vivo* de la molécula citotóxica "SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20" utilizando modelos animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la molécula citotóxica SLT-1A-FR:: $\alpha$ CD20 sobre células neoplásicas. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la molécula 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 CD20 en sus superficies celulares.

#### **Ejemplo 3. Molécula dirigida a células citotóxica que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión carboxi terminal específica para HER2 (SLT-1A-FR unida con $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H)**

En este ejemplo, una región del polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa se derivó de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). La región de unión de tipo inmunoglobulina es  $\alpha$ HER2 V<sub>H</sub>H derivada de una región variable de un solo dominio de la proteína 5F7 de anticuerpo de camélido (V<sub>H</sub>H), tal como se describe en la Solicitud de patente de Estados Unidos 2011/0059090.

#### Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unida con $\alpha$ HER2-

V<sub>H</sub>H"

La región de unión de tipo inmunoglobulina y un polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa, se unen entre sí para formar una molécula dirigida a células citotóxica (véase, por ejemplo, SEQ ID NO: 54). En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región variable  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H derivada de la proteína 5F7 se clona en el marco con un polinucleótido que codifica un enlazador conocido en la técnica y en marco con un polinucleótido que codifica el polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende los aminoácidos de la SEQ ID NO: 22. Las variantes de moléculas citotóxicas "SLT-1A-FR unida con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" se crean de tal manera que la región de unión está opcionalmente situada adyacente al extremo amino-terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga y comprende opcionalmente un motivo de señal de retículo endoplásmico carboxi terminal de la familia KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62). La expresión de las variantes de molécula citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" se logra usando sistemas de traducción de la proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unida con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H"

Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para células HER2+ y células HER2- se determina mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia conocido en la técnica. La B<sub>max</sub> para las variantes "SLT-1A-FR unida con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" a células HER2+ se mide para que sea de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K<sub>D</sub> dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células HER2 en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de las moléculas citotóxicas "SLT-1A-FR unida con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" se determina en una traducción de proteínas *in vitro* libre de células, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libres de células es significativo. La IC<sub>50</sub> de variantes "SLT-1A-FR unida con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unida con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" utilizando un ensayo de eliminación de células HER2+

Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" variantes se determinan por el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células HER2+. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" se determinan por el mismo ensayo de células-kill general usando HER2 células como una comparación con las células HER2+. El CD<sub>50</sub> de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células HER2+ dependiendo de la línea celular. El CD<sub>50</sub> de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) para células que no expresan HER2 en una superficie celular, en comparación con células que expresan HER2 en una superficie celular.

Determinar los efectos *in vivo* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" utilizando modelos animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la molécula citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ HER2-V<sub>H</sub>H" en las células neoplásicas. Varias cepas de ratones se utilizan para probar el efecto de la molécula 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 4. Una molécula dirigida a células citotóxica que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión derivada del anticuerpo  $\alpha$ EpsteinBarr-antígeno (SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EpsteinBarr)**

En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga derivado de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A) resistente a la escisión por proteasa. An-tipo inmunoglobulina región de unión  $\alpha$ Epstein-Barr-antígeno se deriva de un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de Epstein-Barr (colmillo C et al, Immunol Methods J 287: 21-30 (2004)), que comprende una unión de tipo inmunoglobulina región capaz de unirse a una célula de humano infectado 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 las células y el cáncer de Epstein-Barr (por ejemplo, células de cáncer de nasopharyngeal linfoma y). Además, la infección de Epstein-Barr se asocia con otras enfermedades, por ejemplo, esclerosis múltiple.

Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EpsteinBarr"

La región de unión de tipo inmunoglobulina a antígeno  $\alpha$ Epstein-Barr y un polipéptido efector de toxina Shiga resistente a proteasa se unen entre sí, y una KDEL carboxi terminal (SEQ ID NO: 62) se añaden para formar un molécula dirigida a células citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno  $\alpha$ EpsteinBarr "SLT-1A-FR:: $\alpha$ EpsteinBarr::KDEL" ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62). La expresión de la molécula citotóxica "SLT-1A-FR:: $\alpha$ EpsteinBarr::KDEL" ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62) se lleva a cabo utilizando los sistemas de traducción de la proteína, ya sea bacteriano y/o libre de células, como se describe en los ejemplos anteriores.

#### Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con $\alpha$ EpsteinBarr"

Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para células positivas a antígeno EpsteinBarr y células negativas de antígeno EpsteinBarr se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. El  $B_{max}$  para "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EpsteinBarr" a las células positivas al antígeno de Epstein-Barr se mide para ser 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 antígeno de Epstein-Barr células negativas en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ EpsteinBarr" molécula citotóxica se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitor de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El  $IC_{50}$  de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EpsteinBarr" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

#### La determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con $\alpha$ EpsteinBarr" usando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ EpsteinBarr" se determinan mediante el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas al antígeno de Epstein-Barr. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ EpsteinBarr" se determinan por el mismo ensayo de células-kill general usando células negativas de antígeno de Epstein-Barr como una comparación con las células positivas al antígeno de Epstein-Barr. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas a antígeno de Epstein-Barr, dependiendo de la línea celular. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) 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.

#### Determinar los efectos *in vivo* de molécula dirigida a células "SLT-1A-FR unido con $\alpha$ EpsteinBarr" utilizando modelos animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la molécula citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EpsteinBarr" en células neoplásicas. Varias cepas de ratones se utilizan para probar el efecto de la molécula 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 5. Molécula dirigida a células citotóxica que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión derivada del anticuerpo $\alpha$ Leishmania-antígeno (SLT-1A-FR unido con $\alpha$ Leishmania)**

En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido resistente a proteasa de toxina Shiga efector derivado de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Un  $\alpha$ Leishmania-antígeno región de unión de tipo inmunoglobulina se 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 una protozoos trypanosomatid intracelular (ver Silveira T et al., Int J Parasitol 31: 1451-8 (2001); Kenner J et al, J Cutan Pathol 26: 130-6 (1999); Berman J y Dwyer, Clin Exp Immunol 44: 342-348 (1981)).

#### Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con $\alpha$ Leishmania"

La región de unión de tipo inmunoglobulina a antígeno  $\alpha$ -Leishmania- y el polipéptido efector de la toxina Shiga se unen entre sí, y una KDEL carboxi terminal (SEQ ID NO: 62) se añaden para formar un molécula dirigida a células citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de de unión al antígeno Leishmania SLT-1A-FR:: $\alpha$ Leishmania::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62). La expresión de la molécula citotóxica SLT-1A-FR::Leishmania::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62) se lleva a cabo utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Leishmania"

5 Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para células positivas a antígeno Leishmania y células negativas de antígeno de Leishmania se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. El  $B_{max}$  para "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Leishmania" a las células positivas de antígenos de Leishmania se mide para ser 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 antígeno de Leishmania células negativas en este ensayo.

10 La capacidad de inactivación de ribosomas de la "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ Leishmania" molécula citotóxica se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El  $IC_{50}$  de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Leishmania" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

La determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Leishmania" utilizando un ensayo de eliminación celular

20 Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ Leishmania" se determinan mediante el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de antígeno Leishmania. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ Leishmania" se determinan por el mismo ensayo de células-kill general usando células negativas al antígeno Leishmania como una comparación con las células positivas de antígeno Leishmania. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas a antígeno Leishmania dependiendo de la línea celular. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) 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.

**Ejemplo 6. Molécula dirigida a células citotóxica que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión derivada de una región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ Neurotensin-Receptor (SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ NeurotensinR)**

35 En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido resistente a proteasa de toxina Shiga efector derivado de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). An-tipo inmunoglobulina región de unión  $\alpha$ NeurotensinR se deriva de la DARPin™ (GenBank adhesión: 2P2C\_R) o un anticuerpo monoclonal (Ovigne J et al, neuropéptidos. 32: 247-56 (1998)) que se une el receptor de neurotensina humana. El receptor de neurotensina es expresada por varias células cancerosas, tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, melanoma, y células de cáncer pancreático.

Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ NeurotensinR"

45 La región de unión de tipo inmunoglobulina a  $\alpha$ NeurotensinR y el polipéptido efector de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade una KDEL carboxi terminal (SEQ ID NO 62) para formar una molécula dirigida a células citotóxica: y. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de neurotensina-receptor de unión a SLT-1A-FR:: $\alpha$ NeurotensinR::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62). Expresión de la-1A-FR SLT:: $\alpha$ NeurotensinR::KDEL molécula citotóxica ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62) se lleva a cabo utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a célula citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ NeurotensinR"

55 Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para células positivas de receptor de neurotensina y células negativas del receptor de neurotensina se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. El  $B_{max}$  para "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ NeurotensinR" a células positivas del receptor de neurotensina se mide para ser aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una  $K_D$  dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa al receptor de la neurotensina células negativas en este ensayo.

60 La capacidad de inactivación de ribosomas de la "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ NeurotensinR" molécula citotóxica se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El  $IC_{50}$  de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ NeurotensinR" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

La determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a célula citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ NeurotensinR" usando un ensayo de eliminación celular

5 Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ NeurotensinR" se determinan mediante el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de receptor de neurotensina. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ NeurotensinR" se determinan por el mismo ensayo de células-kill general usando células negativas receptor de neurotensina como una comparación con las células positivas del receptor de neurotensina. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de receptor de neurotensina, dependiendo de la línea celular. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) para células que no expresan receptor de neurotensina en una superficie celular, en comparación con células que expresan receptor de neurotensina en una superficie celular.

15 Determinar los efectos *in vivo* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ NeurotensinR" utilizando modelos animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la molécula citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ NeurotensinR" en células neoplásicas. Varias cepas de ratones se utilizan para probar el efecto de la molécula 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.

25 **Ejemplo 7. Molécula dirigida a células que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión derivada de una región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ EGFR (SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EGFR)**

En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido resistente a proteasa de toxina Shiga efector derivado de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). La región de unión  $\alpha$ EGFR se deriva de la AdNectin™ (GenBank adhesión: 3QWQ\_B), el Affibody™ (GenBank adhesión: 2KZI\_A; patente de Estados Unidos 8.598.113), o un anticuerpo, todos los que se unen uno o más humanos receptores del factor de crecimiento epidérmico. La expresión de los receptores del factor de crecimiento epidérmico se asocian con las células humanas de cáncer, tales como, por ejemplo, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de mama y células de cáncer de colon.

35 Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EGFR"

La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ EGFR y el polipéptido efector de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade una KDEL carboxi terminal (SEQ ID 62 NO) para formar un molécula dirigida a células citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a EGFR SLT-1A-FR:: $\alpha$ EGFR::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62). La expresión de la molécula citotóxica SLT-1A-FR:: $\alpha$ EGFR::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62) se lleva a cabo utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

45 Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EGFR"

Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para las células EGFR + y células EGFR-se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. El  $B_{max}$  para "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EGFR" para EGFR + células se mide para ser 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 EGFR células en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ EGFR" molécula citotóxica se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El  $IC_{50}$  de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EGFR" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

60 La determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EGFR" usando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ EGFR" se determinan mediante el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células EGFR +. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ EGFR" se determinan por el mismo ensayo general de célula-kill usando EGFR-células como una comparación con las células positivas de antígeno Leishmania. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células

EGFR +, dependiendo de la línea celular. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) para células que no expresan EGFR en una superficie celular, en comparación con células que expresan EGFR en una superficie celular.

5 Determinar los efectos *in vivo* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EGFR" utilizando modelos animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la molécula citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ EGFR" en células neoplásicas. Varias cepas de ratones se utilizan para probar el efecto de la molécula 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.

15 **Ejemplo 8. Molécula dirigida a células que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión derivada del anticuerpo  $\alpha$ CCR5 (SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5)**

En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido resistente a proteasa de toxina Shiga efector derivado de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). An-tipo inmunoglobulina región de unión  $\alpha$ CCR5 se 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).

20 Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5"

25 La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ CCR5 y el polipéptido efector de la toxina Shiga se unen entre sí, y se añade una KDEL carboxi terminal (SEQ ID 62 NO) para formar un molécula dirigida a células citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a  $\alpha$ CCR5 SLT-1A-FR:: $\alpha$ CCR5::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62). La expresión de la molécula citotóxica SLT-1A-FR:: $\alpha$ CCR5::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62) se lleva a cabo utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

30 Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5"

35 Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para las células CCR5 + y células CCR5 se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. El  $B_{max}$  para "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5" a las células CCR5 + positivos se mide para ser 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 CCR5 células en este ensayo.

40 La capacidad de inactivación de ribosomas de la "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ CCR5" molécula citotóxica se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El  $IC_{50}$  de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

45 La determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5" usando un ensayo de eliminación celular

50 Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ CCR5" se determinan mediante el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células CCR5 +. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ CCR5" se determinan por el mismo ensayo de células-kill general usando células CCR5 como una comparación con las células CCR5 +. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células CCR5 + en función de la línea celular. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) para células que no expresan CCR5 en una superficie celular, en comparación con las células que expresan CCR5 en una superficie celular.

55 Determinar los efectos *in vivo* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5" utilizando modelos animales

60 Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la molécula citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5" en la que agotan las células T a partir de materiales donantes (ver Tsigotis P et al, inmunoterapia. 4: 407-24 (2012)). Los primates no humanos se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5." 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-FR unido con  $\alpha$ CCR5" (véase Weaver T et al, Nat Med. 15: 746-9 (2009)). En el agotamiento *in vivo* de linfocitos T de sangre periférica en primates cynomolgus se

65

observa después de la administración parenteral de diferentes dosis de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ CCR5." El uso de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5" para bloquear la infección por VIH se prueba dando una dosis aguda de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ CCR5" para primates no humanos con el fin de agotar severamente las células T circulantes en la exposición a un virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) (ver Sellier P et al, PLoS One 5: e10570 (2010)).

5 **Ejemplo 9. Molécula dirigida a células que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión derivada de un dominio anti-Env inmunoglobulina (SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env)**

10 En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido efector de toxina resistente a proteasa Shiga derivada de la subunidad A de la toxina Shiga (stxA). Una región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ Env se deriva de anticuerpos existentes que se unen la cubierta del VIH glicoproteína (Env), tales como GP41, GP120, GP140, GP160 o (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 (ver Prabakaran P et al ., Microbiol delantero 3: 277 (2012)). Env son proteínas de superficie del VIH que también se muestran en las superficies celulares de las células infectadas por el VIH durante la replicación del VIH. Aunque Env se expresan en las células infectadas predominantemente en compartimientos endosomal, cantidades suficientes de Env podrían estar presentes en una superficie celular a ser el blanco de un citotóxico, molécula muy potente, dirigido a las células de la invención. Además, Env de metas de moléculas citotóxicas podría obligar viriones de VIH y entrar en las células recién infectadas durante la fusión de viriones con una célula huésped.

25 Dado que el VIH muestra una alta tasa de mutación, es preferible utilizar un dominio de inmunoglobulina que se une una parte constreñida funcional de un Env, tal como se muestra mediante la neutralización en términos generales anticuerpos que se unen Env a partir de múltiples cepas del VIH (van den Kerkhof T et al ., Retrovirology 10: 102 (2013)). Debido a que se cree que los Env presente en la superficie de una célula infectada para presentar epítopos estéricamente restringidos (Chen W et al, J Virol. 88: 1125-1139 (2014)), es preferible usar más pequeño que 100 kD e idealmente menor que 25 kD , como sdAbs o V<sub>H</sub> dominios H.

30 Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env"

35 La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ Env y el polipéptido de la toxina efector proteasa resistente Shiga se unen entre sí, y una KDEL carboxi terminal (SEQ ID NO: 62) se añaden para formar un molécula dirigida a células citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína SLT-1A-FR  $\alpha$ Env vinculante:: $\alpha$ Env::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62). Expresión de la-1A-FR SLT:: $\alpha$ Env::KDEL molécula citotóxica ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62) se lleva a cabo utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

40 Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env"

45 Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para las células Env + y células env se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. El B<sub>max</sub> para "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env" a células positivas Env + se mide para ser aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K<sub>D</sub> dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a env células en este ensayo.

50 La capacidad de inactivación de ribosomas de la "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ Env" molécula citotóxica se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitor de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El IC<sub>50</sub> de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

La determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env" usando un ensayo de eiminación celular

55 Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ Env" se determinan mediante el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células + Env. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ Env" se determinan por el mismo ensayo de células-kill general usando células env como una comparación con las células + Env. El CD<sub>50</sub> de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células de Env + dependiendo de la línea celular y/o la cepa de VIH utilizada para infectar las células para hacerlas Env +. El CD<sub>50</sub> de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) para células que no expresan Env en una superficie celular, en comparación con las células que expresan Env en una superficie celular.

65 Determinar los efectos *in vivo* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env" utilizando modelos animales

El uso de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env" para inhibir la infección por VIH se prueba mediante la administración de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ Env" al virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) infectados primates no humanos (ver Sellier P et al. , PLoS One 5: e10570 (2010)).

5 **Ejemplo 10. Molécula dirigida a células que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión del anticuerpo  $\alpha$ UL18 (SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ UL18)**

10 En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido resistente a proteasa de toxina Shiga efector derivado de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Un  $\alpha$ UL18 región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, a la proteína de citomegalovirus superficie celular UL18, que está presente en las células humanas infectadas con el citomegalovirus (Yang Z, Bjorkman P, Proc Natl Acad Sci Estados Unidos 105: 10095-100 (2008)). La infección por citomegalovirus humano se asocia con varios tipos de cáncer y trastornos inflamatorios.

15 Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ UL18"

20 Se añade para formar un molécula dirigida a células citotóxica: La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ UL18 y el polipéptido efector de la toxina Shiga se unen entre sí, y una KDEL carboxi terminal (SEQ ID 62 NO). Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína SLT-1A-FR  $\alpha$ UL18 vinculante:: $\alpha$ UL18::KDEL ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62). Expresión de la-1A-FR SLT:: $\alpha$ UL18::KDEL molécula citotóxica ('KDEL' divulgada como SEQ ID NO: 62) se lleva a cabo utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

25 Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ UL18"

30 Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para células positivas proteína de citomegalovirus UL18 y UL18 células negativas de proteína de citomegalovirus se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. El  $B_{max}$  para "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ UL18" a la proteína de citomegalovirus células UL18 positivos se mide para ser 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 citomegalovirus proteína UL18 células negativas en este ensayo.

35 La capacidad de inactivación de ribosomas de la "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ UL18" molécula citotóxica se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El  $IC_{50}$  de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ UL18" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

40 La determinación de la citotoxicidad de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ UL18" usando un ensayo de eliminación celular

45 Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ UL18" se determinan mediante el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores usando proteína de citomegalovirus células UL18 positivos. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ UL18" se determinan por el mismo ensayo de células-kill general usando proteína de citomegalovirus UL18 células negativas como una comparación con la proteína de citomegalovirus UL18 células positivas. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas proteína de citomegalovirus UL18 dependiendo de la línea celular. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) 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.

55 **Ejemplo 11. Molécula dirigida a células citotóxica que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa derivada de la subunidad A de la toxina de tipo Shiga 1 y una región de unión derivada de un anticuerpo para antígeno intestinal de helmintos (SLT-1A-FR unido con antígeno intestinal de  $\alpha$ Helmintos)**

60 En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina de tipo Shiga 1 (SLT-1A). Un antígeno intestinal de helminto de la región de unión de tipo inmunoglobulina deriva de un anticuerpo generado, usando técnicas conocidas en el sector, 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 Proteomics M114.046227 (2015)).

65 Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica "SLT-1A-FR unida con antígeno intestinal de  $\alpha$ helmintos"

El antígeno intestinal de helminto de la región de unión de tipo inmunoglobulina y el polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a proteasa se unen entre sí, y opcionalmente se unen junto a un motivo señal del retículo endoplasmático carboxi terminal de la familia KDEL ('KDEL' descrito como SEQ ID NO: 62) para formar una molécula dirigida a células citotóxica. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a SLT-1A-FR::antígeno intestinal de  $\alpha$ helmintos. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A-FR::antígeno intestinal de  $\alpha$ helmintos se logra usando sistemas de traducción de proteínas, ya sean bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

#### Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica " SLT-1A-FR unida con antígeno intestinal de $\alpha$ helmintos "

Las características de unión de la molécula dirigida a células citotóxica de este ejemplo se determina mediante un ensayo de unión molecular conocido en la técnica usando una proteína diana recombinante purificada. La  $K_D$  para "SLT-1A-FR unida con antígeno intestinal de  $\alpha$ helmintos" para dirigir la proteína tras medirla es de aproximadamente 100 nM, mientras que no hay unión significativa a una proteína de control negativo (por ejemplo receptor de transferrina humana, purificada, recombinante,) en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica "SLT-1A-FR unida con antígeno intestinal de  $\alpha$ helmintos" se determina en una traducción de proteínas *in vitro* libre de células, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula dirigida a células citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libres de células es significativo. La  $IC_{50}$  de "SLT-1A-FR unida con antígeno intestinal de  $\alpha$ helmintos" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

#### Determinación de la toxicidad de la proteína citotóxica "SLT-1A-FR unida con antígeno intestinal de $\alpha$ helmintos" utilizando Helmintos

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

Además, los animales de laboratorio que alberga helmintos y/o se presentan enfermedades relacionadas con helmintos se administran " SLT-1A-FR unida con antígeno intestinal de  $\alpha$ helmintos " y se controló para la reducción o eliminación de helmintos y/o síntomas asociados de helmintos (s) parasitaria, tal como asesinato helmintos, el aumento de la esterilidad, reducción de la fecundidad, y la inhibición del crecimiento.

#### **Ejemplo 12. Molécula dirigida a células citotóxica que comprende una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y una región de unión que reconoce una molécula mayor de histocompatibilidad humana complejada con un péptido de un agente infeccioso (SLT-1A-FR unido con $\alpha$ MHC-péptido)**

En este ejemplo, la región de polipéptido efector de la toxina Shiga es un polipéptido efector de toxina resistente a proteasa Shiga derivada de la subunidad A de la toxina Shiga (stxA). Una región de unión de tipo inmunoglobulina que se une a un ser humano, se obtiene o se diseñó a partir de una biblioteca de anticuerpos y/o de tipo inmunoglobulina principal de histocompatibilidad (MHC) molécula complejada con un péptido específico tamiza utilizando técnicas estándar conocidas para el experto (ver Tohidkia . M et al, *J fármaco diana* 20: 195-208 (2012); de Marco A, *Crit Rev Biotechnol* 33: 40-8 (2013); Wen F, Zhao H, *Methods Mol Biol* 1061: 245-64 (2013)).

Por ejemplo, las células humanas infectadas con malaria pueden presentar en sus superficies celulares moléculas MHC de clase I complejadas con antígenos de la *P. falciparum* membrana apical antígeno-1 (AMA1), tales como, por ejemplo, el HLA-A en complejo con el péptido TLDEMRFY (SEQ ID NO: 137) (véase, por ejemplo Lal A et al, *Infect Immun* 64: 1054-9 (1996.); Sedegah M et al, *Malar J* 9:.. 241 (2010); Schwenk R et al, *Malar J* 12 : 376 (2013)). Del mismo modo, las células humanas infectadas con tuberculosis pueden presentar en sus superficies celulares moléculas MHC de clase I complejadas con antígenos de factores de *M. tuberculosis*, tales como, por ejemplo, CFP10, PE/PPE, Rv0288, Rv1886c, Rv3875, y TB10.4, (Axelsson -Robertson R y otros, *Immunology* 129:.. 496-505 (2010); Axelsson-Robertson R et al, *Vaccine Clin Immunol* 18:.. 125-34 (2011); Wang M y otros, *Immunology* 132: 482-91 (. 2011); Axelsson-Robertson R et al, *PLoS One* 8: e58309 (2013)).

#### Construcción, Producción, y Purificación de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con $\alpha$ MHC-péptido"

La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ MHC-péptido y polipéptido toxina efector proteasa resistente Shiga se unen entre sí para formar un molécula dirigida a células citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la SLT-1A-FR::proteína  $\alpha$ MHC-péptido en el que las

regiones de unión se une a un subtipo humano HLA MHC molécula específica complejo con un péptido antigénico de *M. tuberculosis* o *P. falciparum*. Expresión de la SLT-1A-FR::molécula citotóxica  $\alpha$ MHC-péptido se consigue usando, sistemas de traducción de la proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores. Las regiones de unión específicas para otros tipos de HLA complejadas con antígenos de la malaria o antígenos de micobacterias se han diseñado y probado para proporcionar una mejor cobertura de las subpoblaciones humanas.

Determinación de las características *in vitro* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ MHC-péptido"

Las características de unión de la molécula citotóxica de este ejemplo para las células humanas infectadas se determina por un ensayo basado en fluorescencia, citometría de flujo conocido en la técnica. El  $B_{max}$  para "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ MHC-péptido" a las células presentadoras de antígeno se mide para ser 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 de control negativo en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ MHC-péptido" molécula citotóxica se determina en una, la traducción de proteínas libre de células *in vitro* como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. El  $IC_{50}$  de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ MHC-péptido" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100  $\mu$ M.

La determinación de la citotoxicidad de de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ MHC-péptido" Uso de un ensayo de células-Kill

Las características de citotoxicidad de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ MHC-péptido" se determinan mediante el ensayo general de célula-kill como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células infectadas y/o células presentadoras de antígenos positivos para los complejos específicos de moléculas de péptido MHC. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "SLT-1A-FR enlaces con  $\alpha$ MHC-péptido" se determinan por el mismo ensayo general de célula-kill. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para MHC-péptido + células dependiendo de la línea celular. El  $CD_{50}$  de la molécula citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxicos) para células que no expresan la misma MHC-péptido en una superficie celular, en comparación con células que presentan un, MHC-péptido dirigido específicamente sobre una superficie celular.

Determinar los efectos *in vivo* de la molécula dirigida a células citotóxica "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ MHC-péptido" utilizando modelos animales

El uso de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ MHC-péptido" para inhibir infecciones por Plasmodium o Mycobacterium se prueba mediante la administración de "SLT-1A-FR unido con  $\alpha$ MHC-péptido" para modelos animales de las infecciones de malaria, Mycobacterium, infecciones de esporozoitos, y etapa hígado Plasmodium infecciones parasitarias. Este tipo de complejo MHC-péptido - objetivo terapéutico puede ser particularmente útil en mycobacterium o Plasmodium individuos infectados que también están comprometidos inmuno-, tales como, por ejemplo, asplenia, T-celular deficiente, y/o pacientes infectados por VIH.

**Ejemplo 13. Moléculas dirigidas a células citotóxicas que comprende regiones efectoras de a toxina Shiga resistente a a escisión por proteasa y regiones de unión que reconocen varios tipos de células**

En este ejemplo, la región de polipéptido toxina efector Shiga es un polipéptido resistente a proteasa de toxina Shiga efector derivado 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) con un sitio sensible a la proteasa alterado en la secuencia de aminoácido que se produce de forma nativa en 248-251 para SLT-1A y stxA o 247-250 para SLT-2A. Una región de unión se deriva del dominio de inmunoglobulina de la molécula elegida de la columna 1 de la Tabla 5 y que se une la biomolécula diana extracelular indica en la columna 2 de la Tabla 5. Las moléculas dirigidas a células ejemplares de este ejemplo están opcionalmente creado con un carboxi- terminal de motivo señal de tipo KDEL y/o agente de detección usando reactivos y técnicas conocidas en la técnica la promoción. Los, citotóxicos, moléculas dirigidas a células ejemplares de este ejemplo se ensayaron como se describe en los ejemplos anteriores utilizando células que expresan las biomoléculas diana extracelulares apropiados. Las moléculas dirigidas a células ejemplares de este ejemplo se pueden usar, por ejemplo, para diagnosticar y tratar enfermedades, afecciones y/o trastornos indicados en la columna 3 de la Tabla 5.

**Tabla 5.** Varias regiones de unión para el direccionamiento celular de polipéptidos derivados de la subunidad A de toxina Shiga resistente a la escisión por furina

Origen de la región de unión	Diana extracelular	Aplicación o aplicaciones
alemtuzumab	CD52	cánceres de células B, tales como linfoma y

ES 2 919 749 T3

		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 $\alpha$ 4	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 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
to situmomab	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

ES 2 919 749 T3

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); Olafesn 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 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 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 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 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 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 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 inhibitoria (véase, por ejemplo, Zhao A et al., J Immunol Methods 363: 221-32 (2011))
anticuerpo o anticuerpos 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 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 de unión a	Eph-B2	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y

Eph-B2		cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Abéngozar M et al., Blood 119: 4565-76 (2012))
anticuerpo o anticuerpos 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 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 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- $\alpha$	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- $\alpha$	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- $\alpha$	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- $\alpha$	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante
infiximab	TNF- $\alpha$	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- $\alpha$	varios cánceres y trastornos inmunitarios
olokizumab	IL6	varios cánceres y trastornos inmunitarios
ozoralizumab	TNF- $\alpha$	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 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))

La presente invención es tal como se describe en las reivindicaciones. 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, sin exceder el alcance de las reivindicaciones.

5

Listado de secuencias		
Número ID	Descripción del texto	Secuencia biológica

ES 2 919 749 T3

SEQ ID NO: 1	Subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNRLRI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA RMASDEFPSMCPADGRVRGITH NKILWDSSTLGAILMRRTISS
SEQ ID NO: 2	Subunidad A de la toxina Shiga	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNRLRI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA RMASDEFPSMCPADGRVRGITH NKILWDSSTLGAILMRRTISS
SEQ ID NO: 3	Subunidad A de la toxina semejante a Shiga 2 (SLT-2A)	DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI STPLGNISQGGVSVSVINHVLGG NYISLNVRLDYPYSERFNHLRLI MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSLL QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL DLMEFRGRSMTRASSRAMLRFV TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL GSVAVILNCHSTGYSVRSVSQK QKTECQIVGDRAAIKVNVLWE ANTIAALLNRKPQDLTEPNQ
SEQ ID NO: 4	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 1	NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSG  RSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSV LPDYHGQDSVRVGRISFGSINAIL GSVALILNCHHHASRVA
SEQ ID NO: 5	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 2	NLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSLLQRIA DLERTGMQIGRHSLVGSYLDLM EFRGRSMTRASSRAMLRFVTVIA EALRFRQIQRGFRPALSEASPLY TMTAQDVDLTLNWGRISNVLPE YRGEEGVRIGRISFNLSAILGSV AVILNCHSTGYSVA

ES 2 919 749 T3

SEQ ID NO: 6	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 3	NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSG RSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSV LPDYHGQDSVRVGRISFGSINAIL GSVALILNCHHHASAVAR
SEQ ID NO: 7	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 4	NLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIA DLERTGMQIGRHSLVGSYLDLM EFRGRSMTRASSRAMLRFVTVIA EALRFRQIQRGFRPALSEASPLY TMTAQDVDLTLNWGRISNVLPE YRGEEGVRIGRISFNLSAILGSV AVILNCHSTGSASVR
SEQ ID NO: 8	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 5	NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSG RSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSV LPDYHGQDSVRVGRISFGSINAIL GSVALILNCHHHASAVAA
SEQ ID NO: 9	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 6	NLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIA DLERTGMQIGRHSLVGSYLDLM EFRGRSMTRASSRAMLRFVTVIA EALRFRQIQRGFRPALSEASPLY TMTAQDVDLTLNWGRISNVLPE YRGEEGVRIGRISFNLSAILGSV AVILNCHSTGSASVA
SEQ ID NO: 10	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 7	NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSG RSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSV LPDYHGQDSVRVGRISFGSINAIL  GSVALILNCHHHASRVAAMASD EFPSMC
SEQ ID NO: 11	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 8	NLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIA DLERTGMQIGRHSLVGSYLDLM EFRGRSMTRASSRAMLRFVTVIA EALRFRQIQRGFRPALSEASPLY TMTAQDVDLTLNWGRISNVLPE YRGEEGVRIGRISFNLSAILGSV AVILNCHSTGSYSVASVSQKQKT EC

ES 2 919 749 T3

SEQ ID NO: 12	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 9	NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALFRQIQRGFRTTLDLDSG RSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSV LPDYHGQDSVRVGRISFGSINAIL GSVALILNCHHHASAVARMASD EFPSMC
SEQ ID NO: 13	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 10	NLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIA DLERTGMQIGRHSLVGSYLDLM EFRGRSMTRASSRAMLRFVTVIA EALFRQIQRGFRPALSEASPLY TMTAQDVDLTLNWGRISNVLPE YRGEEGVRIGRISFNLSAILGSV AVILNCHSTGSASVRSVSQKQKT EC
SEQ ID NO: 14	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 11	NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALFRQIQRGFRTTLDLDSG RSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSV LPDYHGQDSVRVGRISFGSINAIL GSVALILNCHHHASAVAAMASD EFPSMC
SEQ ID NO: 15	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 12	NLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIA DLERTGMQIGRHSLVGSYLDLM EFRGRSMTRASSRAMLRFVTVIA EALFRQIQRGFRPALSEASPLY TMTAQDVDLTLNWGRISNVLPE YRGEEGVRIGRISFNLSAILGSV AVILNCHSTGSASVASVSQKQKT EC
SEQ ID NO: 16	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 13	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSD NLFAVDVRGIDPEEGRFNRLRI VERNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALFRQIQRGFRTTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASRVA A

ES 2 919 749 T3

<p>SEQ ID NO: 17</p>	<p>Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 14</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCHHHASRVA          A</p>
<p>SEQ ID NO: 18</p>	<p>Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 15</p>	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI          STPLGNISQGGVSVSVINHVLGG          NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI          MERNNLYVAGFINDETNIYRFS          DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL          QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL          DLMEFRGRSMTRASSRAMLRFV          TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS          PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV          LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL          GSVAVILNCHSTGYSYVR</p>
<p>SEQ ID NO: 19</p>	<p>Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 16</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCHHHASAVA          R</p>
<p>SEQ ID NO: 20</p>	<p>Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 17</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS</p> <hr/> <p>YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCHHHASAVA          R</p>

SEQ ID NO: 21	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 18	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI  STPLGNISQGGVSVSVINHLVGG  NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI  MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS  DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL  QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL  DLMEFRGRSMTRASSRAMLRFV  TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS  PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV  LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL  GSVAVILNCHSTGSASVA</p>
SEQ ID NO: 22	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 19	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI  GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD  NLFAVDVRGIDPEEGRFNHLRLI  VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF  ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT  TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS  YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR  FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD  DLSGRSYVMATAEDVDLTLNWG  RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG  SINAILGSVALILNCHHHASAVA  A</p>
SEQ ID NO: 23	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 20	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI  GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD  NLFAVDVRGIDPEEGRFNHLRLI  VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF  ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT  TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS  YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR  FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD  DLSGRSYVMATAEDVDLTLNWG  RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG  SINAILGSVALILNCHHHASAVA  A</p>
SEQ ID NO: 24	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 21	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI  STPLGNISQGGVSVSVINHLVGG  NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI  MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS  DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL  QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL  DLMEFRGRSMTRASSRAMLRFV  TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS  PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV</p> <hr/> <p>LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL  GSVAVILNCHSTGSASVA</p>

<p>SEQ ID NO: 25</p>	<p>Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 22</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD          NLFAVDVVRGIDPEEGRFNRLRI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCHHHASRVA          AMASDEFPSMC</p>
<p>SEQ ID NO: 26</p>	<p>Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 23</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD          NLFAVDVVRGIDPEEGRFNRLRI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCHHHASRVA          AMASDEFPSMC</p>
<p>SEQ ID NO: 27</p>	<p>Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 24</p>	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI          STPLGNISQGGVS SVVINHVLGG          NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI          MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS          DFSHISVPDVITVSMTDSSYSSL          QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL          DLMEFRGRSMTRASSRAMLRFV          TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS          PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV          LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL          GSVAVILNCHSTGSSVSVASVSQK          QKTEC</p>
<p>SEQ ID NO: 28</p>	<p>Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 25</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD          NLFAVDVVRGIDPEEGRFNRLRI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCHHHASAVA          RMASDEFPSMC</p>

ES 2 919 749 T3

SEQ ID NO: 29	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 26	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI            GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD            NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI            VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF            ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT            TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS            YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR            FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD            DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG            RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG            SINAILGSVALILNCHHHASAVA            RMASDEFPSMC</p>
SEQ ID NO: 30	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 27	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI            STPLGNISQGGVSVSVINHVLGG            NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI            MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS            DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL            QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL            DLMEFRGRSMTRASSRAMLRFV            TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS            PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV            LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL            GSVAVILNCHSTGSASVRSVSQK            QKTEC</p>
SEQ ID NO: 31	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 28	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI            GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD            NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI            VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF            ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT            TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS            YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR            FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD            DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG            RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG            SINAILGSVALILNCHHHASAVA            AMASDEFPSMC</p>
SEQ ID NO: 32	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 29	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI            GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD            NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI            VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF            ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT            TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS            YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR            FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD            DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG            RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG            SINAILGSVALILNCHHHASAVA            AMASDEFPSMC</p>

ES 2 919 749 T3

SEQ ID NO: 33	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 30	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI STPLGNISQGGVSVSVINHLVGG</p> <hr/> <p>NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL DLMEFRGRSMTRASSRAMLRV TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL GSVAVILNCHSTGSASVASVSQK QKTEC</p>
SEQ ID NO: 34	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 31	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNLRLLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRRTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASMAS DEFPSMC</p>
SEQ ID NO: 35	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 32	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNLRLLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRRTLD DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG SINAILGSVALILNCHHHASMAS DEFPSMC</p>
SEQ ID NO: 36	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 33	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI STPLGNISQGGVSVSVINHLVGG NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL DLMEFRGRSMTRASSRAMLRV TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL GSVAVILNCHSTGSSVSQKQKTE C</p>
SEQ ID NO: 37	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 34	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD NLFAVDVRGIDPEEGRFNLRLLI VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF</p>

		<p>ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCHHHAS</p>
SEQ ID NO: 38	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 35	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCHHHAS</p>
SEQ ID NO: 39	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 36	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI          STPLGNISQGGVSVSVINHVLGG          NYISLNVVRGLDPYSERFNHLRLI          MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS          DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL          QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL          DLMEFRGRSMTRASSRAMLRFV          TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS          PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV          LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL          GSVAVILNCHSTGS</p>
SEQ ID NO: 40	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 37	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNCH</p>

ES 2 919 749 T3

SEQ ID NO: 41	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 38	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG</p> <hr/> <p>SINAILGSVALILNCH</p>
SEQ ID NO: 42	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 39	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI          STPLGNISQGGVSVSVINHVLLGG          NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI          MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS          DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL          QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL          DLMEFRGRSMTRASSRAMLRV          TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS          PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV          LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL          GSVAVILNCH</p>
SEQ ID NO: 43	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 40	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG</p> <p>SINAILGSVALILN</p>
SEQ ID NO: 44	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 41	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG</p> <p>SINAILGSVALILN</p>
SEQ ID NO: 45	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 42	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI          STPLGNISQGGVSVSVINHVLLGG          NYISLNVRLDPYSERFNHLRLI          MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS          DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL          QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL          DLMEFRGRSMTRASSRAMLRV          TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS          PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV          LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL          GSVAVILN</p>

ES 2 919 749 T3

SEQ ID NO: 46	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 43	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT</p> <hr/> <p>TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALIL</p>
SEQ ID NO: 47	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 44	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALIL</p>
SEQ ID NO: 48	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 45	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAI          STPLGNISQGGVSVSVINHVLGG          NYISLNVRLDYPYSERFNHLRLI          MERNNLYVAGFINTETNIFYRFS          DFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSL          QRIADLERTGMQIGRHSLVGSYL          DLMEFRGRSMTRASSRAMLRV          TVIAEALRFRQIQRGFRPALSEAS          PLYTMTAQDVDLTLNWGRISNV          LPEYRGEEGVRIGRISFNLSAIL          GSVAVIL</p>
SEQ ID NO: 49	Polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa SLT-1A-FR, variante 46	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI          GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGD          NLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLLI          VERNNLYVTGFVNRTNNVFYRF          ADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYT          TLQRVAGISRTGMQINRHSLTTS          YLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR          FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLD          DLSGRSYVMTAEDVDLTLNWG          RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFG          SINAILGSVALILNPADGRVRGIT          HNKILWDSSTLGAILMRRTISS</p>

<p>SEQ ID NO: 50</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: <math>\alpha</math>CD20::SLT-1A-FR, variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRRTL DDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF GSINAILGSVALILNCHHHASAV AAEFKPKSTPPGSSGGAPMQVQL QQPGAELVKPGASVKMSCKTSG YTFTSYNVHWVKQTPGQGLEWI GAIYPGNGDTSFNQKFKGKATL TADKSSSTVYMQLSLTSSEDAV YYCARSNYGSSYVWFFDVWG AGTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEG SQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTC RASSSVSYMDWYQQKPGSSPKP WIYATSNLASGVPARFSGSGSGT SYSLTISRVEAEDAATYYCQQWI SNPPTFGAGTKLELK</p>
<p>SEQ ID NO: 51</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: <math>\alpha</math>CD20::SLT-1A-FR, variante 2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRRTL DDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF GSINAILGSVALILNCHHHASAV AAGGGGSGGMQVQLVQSGAEL VKPGASVKMSCKASGYTFTSYN MHWVKQTPGQGLEWIGAIYPG NGDTSYNQKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSSEDAVYYCAR AQLRPNYWYFDVWGAGTTVTV SSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSDIVLSQSPAILSASPGEK VTMTCRASSSVSYMHWYQQKP GSSPKWIYATSNLASGVPARFS GSGSGTSYSLTISRVEAEDAATY YCQQWISNPPTFGAGTKLELK</p>

<p>SEQ ID NO: 52</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: <math>\alpha</math>CD20::SLT-1A-FR, variante 3</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL  IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTL  DDL SGRSYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF  GSINAILGSVALILNCHHHASAV  AAEFKPSTPPGSSGGAPMQVQL  QQPGAELVKPGASVKMSCKASG  YTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWI  GAIYPGNGDTSYNQKFKGKATL  TADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAV  YYCARSTYYGGDWYFNWGA  GTTVTVSAGSTSGSGKPGSGEGS  TKGQIVLSQSPAILSASPGEKVT  MTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSP  KPWIYATSNLASGVPVRFSGSGS  GTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ  WTSNPPTFGGGTKLEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 53</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: <math>\alpha</math>CD20::SLT-1A-FR, variante 4</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL  IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTL  DDL SGRSYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF  GSINAILGSVALILNCHHHASAV  AAEFKPSTPPGSSGGAPGILGFV  FTLMQVQLQQPGAELVKPGASV  KMSCKTSGYTFTSYNVHWVKQ  TPGQGLEWIGAIYPGNGDTSFNQ  KFKGKATLTADKSSSTVYMQLS  SLTSEDSAVYYCARSNYYGSSY  VWFFDVWGAGTTVTVSSGSTSG  SGKPGSGEGSQIVLSQSPTILSAS  PGEKVTMTCRASSSVSYMDWY  QQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP  ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAED  AATYYCQQWISNPPTFGAGTKL  ELK</p>

ES 2 919 749 T3

<p>SEQ ID NO: 54</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: HER2-V<sub>H</sub>H::SLT-1A-FR</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG  DNLFAVDVVRGIDPEEGRFNNLRL  IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTL  DDLSSGRSYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF  GSINAILGSVALILNCHHHASAV  AAHSEDPSSKAPKAPEVQLVES  GGGLVQAGGSLRLSCAASGITFS  INTMGWYRQAPGKQRELVALLS  SIGDTYYADSVKGRFTISRDNAL  NTVYLLQMNLSLKPEDTAVVYCK  RFRRTAAQGTQDYWGQGTQVTVS</p> <hr/> <p>S</p>
<p>SEQ ID NO: 55</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: αCD20-FN3::StxA-FR::KDEL</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG  DNLFAVDVVRGIDPEEGRFNNLRL  IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTL  DDLSSGRSYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF  GSINAILGSVALILNCHHHASAV  AAEFKPKSTPPGSSGGAPASVSD  VPRDLEVVAATPTSLISWCRQR  CADSYRITYGETGGNSPVQEFTV  PGSWKTATISGLKPGVDYITIVY  VVTHYYGWDRYSHPIINRYRTG  SKDEL</p>

<p>SEQ ID NO: 56</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: IL2::SLT-1A-FR::KDEL, variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL  IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRRTL  DDL SGRSYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF  GSINAILGSVALILNCHHHASAV  AAEFKPKSTPPGSSGGAPAPTSSS  TKKTQLQLEHLLLDLQMLNGIN  NYKNPKLTRMLTFKFYMPKKAT  ELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQ  SKNFHLRPRDLISNINVIVLELKG  SETTFMCEYADETATIVEFLNRW  ITFCQSIISTLTKDEL</p>
<p>SEQ ID NO: 57</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: αCD38::SLT-1A-FR, variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL  IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRRTL  DDL SGRSYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF  GSINAILGSVALILNCHHHASAV  AAEFKPKSTPPGSSGGAPDIELTQ  SPSSFVSLGDRVITITCKASEDIY  NRLAWYQQKPGNAPRLLISGAT</p> <hr/> <p>SLETGVPSRFRSGSGSGKDYTLSIT  SLQTEDVATYYCQQYWSTPTFG  GGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGS  KVQLQESGPSLVQPSQRLSITCT  VSGFSLISYGVHWVRQSPGKGL  EWLGVIWRGGSTDYNAAFMSR  LSITKDNSKSQVFFKMNSLQAD  DTAIYFCAKTLITTGYAMDYWG  QGTTVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 58</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: SLT-1A-FR::<math>\alpha</math>HER2scFv, variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRI  IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTL  DDLSSGRSYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF  GSINAILGSVALILNCHHHASAV  AAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMT  QSPSSLSASVGDRVTITCRASQD  VNTAVAWYQQKPKGKAPKLLIYS  ASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLT  ISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPT  FGQGTKVEIKRTGSTSGSGKPGS  GEGSEVQLVESGGGLVQPGGSL  RLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAE  GKGLEWVARIYPTNGYTRYADS  VKGRFTISADTSKNTAYLQMNS  LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA  MDVWGQGTLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 59</p>	<p>Molécula dirigida a células citotóxica: SLT-1A-FR::<math>\alpha</math>CD19scFv, variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL  IVERNNLYVTGFVNRTNNVFYR  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTL  DDLSSGRSYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF  GSINAILGSVALILNCHHHASAV  AAEFPKPSTPPGSSGGAPDIVMT  QAAPSIPVTPGESVSISCRSSKSL  LNSNGNTYLYWFLQRPQGQSPQL  LIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSGT  AFTLRISRVEAEDVGVYYCMQH  LEYPFTFGAGTKLELKGSTSGSG  KPGSGEGSEVQLQQSGPELIKPG</p>

		<p>ASVKMSCKASGYTFTSYVMHW                  VKQKPGQGLEWIGYINPYNDGT                  KYNEKFKGKATLTSKSSSTAY                  MELSSLTSEDSAVYYCARGTYY                  YGSRVFDYWGQGTTLTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 60</p>	<p>Molécula dirigida a células                  citotóxica: SLT-1A-FR::<math>\alpha</math>Cd74scFv,                  variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS                  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG                  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL                  IVERNLYVTGFVNRTNNVFYR                  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY                  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT                  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML                  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRITL                  DDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW                  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF                  GSINAILGSVALILNCHHHASAV                  AAFFPKPSTPPGSSGGAPDIQLTQ                  SPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLV                  HRNGNTYLHWFQQRPGQSPRL                  IYTVSNRFSGVPRFSGSGSGTD                  FTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSH                  VPPTFGAGTRLEIKGSTSGSGKP                  GSGEGSTKGQVQLQQSGSELKK                  PGASVKVSCKASGYTFTNYGVN                  WIKQAPGQGLQWMGWINPNTG                  EPTFDDDFKGRFAFSLDTSVSTA                  YLQISSLKADDTAVYFCSRSGK                  NEAWFAYWGQGTTLTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 61</p>	<p>Molécula dirigida a células                  citotóxica: SLT-1A-FR:: región de                  unión a HER2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS                  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG                  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRL                  IVERNLYVTGFVNRTNNVFYR                  FADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSY                  TTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT                  SYLDLMSHSGTSLTQSVARAML                  RFVTVTAEALRFRQIQRGFRITL                  DDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW                  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISF                  GSINAILGSVALILNCHHHASAV                  AAFFPKPSTPPGSSGGAPRGSHH                  HHHHGSDLGKKLLEAARAGQD                  DEVRILMANGADVNAKDEYGL                  TPLYLATAHGHLEIVEVLLKNG                  ADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHL                  EIAEVLLKHGADVNAQDKFGKT                  AFDISIGNGNEDLAEILQKLN</p>

ES 2 919 749 T3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MOLECULAR TEMPLATES, INC.

5 <120> POLIPÉPTIDOS EFECTORES DE LA SUBUNIDAD A DE LA TOXINA DE SHIGA  
RESISTENTES A LA ESCISIÓN POR PROTEASA Y MOLÉCULAS DIRIGIDAS A CÉLULAS QUE  
LOS COMPRENDEN

<130> P45654EP-D1-PCT

10 <140> EP15733018.4  
<141> 2015-06-10

<150> PCT/US2015/012970  
<151> 2015-01-26

15 <150> 62/010,918  
<151> 2014-06-11

<160> 137

20 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
<211> 293  
25 <212> PRT  
<213> Escherichia coli

<400> 1  
30 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  
35 20 25 30

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

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

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

50 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  
55 100 105 110

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

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

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

ES 2 919 749 T3

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 5 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 10 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 15 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220  
 20 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 25 Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu  
 245 250 255  
 30 Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His  
 260 265 270  
 35 Arg Thr Ile Ser Ser  
 290  
 <210> 2  
 <211> 293  
 <212> PRT  
 40 <213> shigella dysenteriae  
 <400> 2  
 45 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 50 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 25 30  
 55 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn  
 35 40 45  
 60 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 65 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 70 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 75 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110

ES 2 919 749 T3

5 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 10 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser  
 130 135 140  
 15 His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
 20 Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 25 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 30 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 35 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220  
 40 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 45 Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu  
 245 250 255  
 50 Phe Pro Ser Met Cys Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His  
 260 265 270  
 55 Asn Lys Ile Leu Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg  
 275 280 285  
 60 Arg Thr Ile Ser Ser  
 290  
 65 <210> 3  
 <211> 297  
 <212> PRT  
 <213> Escherichia coli  
 <400> 3  
 Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 60 Leu Asn Ser Ile Arg Ser Ala Ile Ser Thr Pro Leu Gly Asn Ile Ser  
 20 25 30  
 65 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn  
 35 40 45

ES 2 919 749 T3

Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe  
 50 55 60  
 5 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
 65 70 75 80  
 10 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 15 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  
 115 120 125  
 20 Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu  
 130 135 140  
 25 Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
 30 Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 35 Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr  
 180 185 190  
 40 Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val  
 195 200 205  
 45 Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser  
 210 215 220  
 50 Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn  
 225 230 235 240  
 55 Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Arg Ser Val Ser Gln Lys Gln  
 245 250 255  
 Lys Thr Glu Cys Gln Ile Val Gly Asp Arg Ala Ala Ile Lys Val Asn  
 260 265 270  
 60 Asn Val Leu Trp Glu Ala Asn Thr Ile Ala Ala Leu Leu Asn Arg Lys  
 275 280 285  
 65 Pro Gln Asp Leu Thr Glu Pro Asn Gln  
 290 295  
 <210> 4  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 919 749 T3

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 5  
 <400> 4  
 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 1 5 10 15  
 10 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 20 25 30  
 15 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 35 40 45  
 20 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 50 55 60  
 25 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
 65 70 75 80  
 30 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 85 90 95  
 35 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
 100 105 110  
 40 Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
 115 120 125  
 45 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
 130 135 140  
 50 Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly  
 145 150 155 160  
 55 Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala  
 165 170 175  
 60 Ala  
 65 <210> 5  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 <400> 5  
 Asn Leu Tyr Val Ala Gly Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr  
 1 5 10 15

ES 2 919 749 T3

Arg Phe Ser Asp Phe Ser His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val  
 20 25 30  
 5 Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp  
 35 40 45  
 10 Leu Glu Arg Thr Gly Met Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser  
 50 55 60  
 15 Tyr Leu Asp Leu Met Glu Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser  
 65 70 75 80  
 20 Ser Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg  
 85 90 95  
 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser  
 100 105 110  
 25 Pro Leu Tyr Thr Met Thr Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp  
 115 120 125  
 30 Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val  
 130 135 140  
 35 Arg Ile Gly Arg Ile Ser Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser  
 145 150 155 160  
 40 Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Ala  
 165 170 175  
 <210> 6  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 50 <400> 6  
 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 1 5 10 15  
 55 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 20 25 30  
 60 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 35 40 45  
 65 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 50 55 60  
 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val



ES 2 919 749 T3

Pro Leu Tyr Thr Met Thr Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp  
 115 120 125

5 Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val  
 130 135 140

10 Arg Ile Gly Arg Ile Ser Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser  
 145 150 155 160

15 Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His Ser Thr Gly Ser Ala Ser Val Arg  
 165 170 175

<210> 8  
 <211> 177  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 8  
 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 1 5 10 15

30 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 20 25 30

35 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 35 40

40 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 50 55 60

45 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
 65 70 75 80

50 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 85 90 95

55 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
 100 105 110

60 Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
 115 120 125

65 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
 130 135 140

70 Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly  
 145 150 155 160

75 Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala

ES 2 919 749 T3

165 170 175

5 Ala

10 <210> 9  
<211> 176  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 9  
Asn Leu Tyr Val Ala Gly Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr  
1 5 10 15

25 Arg Phe Ser Asp Phe Ser His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val  
20 25 30

30 Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp  
35 40 45

35 Leu Glu Arg Thr Gly Met Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser  
50 55 60

40 Tyr Leu Asp Leu Met Glu Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser  
65 70 75 80

45 Ser Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg  
85 90 95

50 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser  
100 105 110

55 Pro Leu Tyr Thr Met Thr Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp  
115 120 125

60 Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val  
130 135 140

65 Arg Ile Gly Arg Ile Ser Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser  
145 150 155 160

70 Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His Ser Thr Gly Ser Ala Ser Val Ala  
165 170 175

75 <210> 10  
<211> 187  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

80 <220>  
<221> fuente

ES 2 919 749 T3

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

<400> 10

5 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 1 5 10 15

10 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 20 20

15 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 35 40 45

20 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 50 55 60

25 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
 65 70 75 80

30 Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
 85 90 95

35 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
 100 105 110

40 Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
 115 120 125

45 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
 130 135 140

50 Val Arg Val Gly Arg Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly  
 145 150 155 160

55 Ser Val Ala Leu Ile Leu Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala  
 165 170 175

60 Ala Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met Cys  
 180 185

<210> 11

<211> 186

<212> PRT

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

60 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 11

65 Asn Leu Tyr Val Ala Gly Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr  
 1 5 10 15

Arg Phe Ser Asp Phe Ser His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val  
 20 25 30

ES 2 919 749 T3

Ser Met Thr Thr Asp Ser Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp  
 35 40 45

5 Leu Glu Arg Thr Gly Met Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser  
 50 55 60

10 Tyr Leu Asp Leu Met Glu Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser  
 65 70 75 80

15 Ser Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg  
 85 90 95

20 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser  
 100 105 110

25 Pro Leu Tyr Thr Met Thr Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp  
 115 120 125

30 Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val  
 130 135 140

35 Arg Ile Gly Arg Ile Ser Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser  
 145 150 155 160

40 Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Ala  
 165 170 175

45 Ser Val Ser Gln Lys Gln Lys Thr Glu Cys  
 180 185

<210> 12  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

50 <400> 12  
 Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
 1 5 10 15

55 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
 20 25 30

60 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
 35 40 45

65 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
 50 55 60

Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val



ES 2 919 749 T3

Pro Leu Tyr Thr Met Thr Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp  
115 120 125

5 Gly Arg Ile Ser Asn Val Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val  
130 135 140

10 Arg Ile Gly Arg Ile Ser Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser  
145 150 155 160

15 Val Ala Val Ile Leu Asn Cys His Ser Thr Gly Ser Ala Ser Val Arg  
165 170 175

20 Ser Val Ser Gln Lys Gln Lys Thr Glu Cys  
180 185

<210> 14  
<211> 187  
<212> PRT  
25 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<221> fuente  
30 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 14  
Asn Leu Tyr Val Thr Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr  
1 5 10 15

35 Arg Phe Ala Asp Phe Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val  
20 25 30

40 Thr Leu Ser Gly Asp Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly  
35 40 45

45 Ile Ser Arg Thr Gly Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser  
50 55 60

50 Tyr Leu Asp Leu Met Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val  
65 70 75 80

Ala Arg Ala Met Leu Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg  
85 90 95

55 Phe Arg Gln Ile Gln Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser  
100 105 110

60 Gly Arg Ser Tyr Val Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn  
115 120 125

65 Trp Gly Arg Leu Ser Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser  
130 135 140

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



<210> 16  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 10  
 <400> 16  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 15 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn  
 35  
 25 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 30 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  
 35 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 40 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 45 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser  
 130 135 140  
 50 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  
 55 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 60 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 65 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 2 919 749 T3

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

5 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240

10 Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Ala  
 245 250

15 <210> 18  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

25 <400> 18  
 Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15

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

35 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn  
 35 40 45

40 Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe  
 50 55 60

45 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
 65 70 75 80

50 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser  
 85 90 95

55 His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser  
 100 105 110

60 Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met  
 115 120 125

65 Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu  
 130 135 140

70 Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160

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

80 Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr

ES 2 919 749 T3

180 185 190

5 Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val  
195 200 205

10 Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser  
210 215 220

15 Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn  
225 230 235 240

20 Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Arg  
245 250

25 <210> 19  
<211> 251  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

30 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
<400> 19

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 919 749 T3

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 5 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 10 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 15 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220  
 20 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 25 Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Arg  
 245 250  
 30 <210> 20  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 35 <400> 20  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 40 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 25 30  
 45 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn  
 35 40 45  
 50 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 55 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 60 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 65 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 70 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 75 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser

ES 2 919 749 T3

130 135 140

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

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

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

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

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

30 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
225 230 235 240

35 Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Arg  
245 250

<210> 21  
<211> 250  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

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

40 <400> 21  
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

50 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn  
35 40 45

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

60 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
65 70 75 80

65 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser  
85 90 95

His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser  
100 105 110

ES 2 919 749 T3

Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met  
 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

Cys His Ser Thr Gly Ser Ala Ser Val Ala  
 245 250

<210> 22  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 22  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

65 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

ES 2 919 749 T3

5 His Val Thr Phe<sub>100</sub> Pro Gly Thr Thr Ala<sub>105</sub> Val Thr Leu Ser Gly<sub>110</sub> Asp Ser  
 10 Ser Tyr Thr<sub>115</sub> Thr Leu Gln Arg Val<sub>120</sub> Ala Gly Ile Ser Arg<sub>125</sub> Thr Gly Met  
 15 Gln Ile<sub>130</sub> Asn Arg His Ser Leu<sub>135</sub> Thr Thr Ser Tyr Leu<sub>140</sub> Asp Leu Met Ser  
 20 His Ser Gly Thr Ser Leu<sub>150</sub> Thr Gln Ser Val<sub>155</sub> Ala Arg Ala Met Leu Arg<sub>160</sub>  
 25 Phe Val Thr Val<sub>165</sub> Thr Ala Glu Ala Leu Arg<sub>170</sub> Phe Arg Gln Ile Gln Arg<sub>175</sub>  
 30 Gly Phe Arg Thr<sub>180</sub> Thr Leu Asp Asp Leu<sub>185</sub> Ser Gly Arg Ser Tyr<sub>190</sub> Val Met  
 35 Thr Ala Glu<sub>195</sub> Asp Val Asp Leu Thr<sub>200</sub> Leu Asn Trp Gly Arg<sub>205</sub> Leu Ser Ser  
 40 Val Leu<sub>210</sub> Pro Asp Tyr His Gly<sub>215</sub> Gln Asp Ser Val<sub>220</sub> Arg Val Gly Arg Ile  
 45 Ser Phe Gly Ser Ile Asn<sub>230</sub> Ala Ile Leu Gly Ser<sub>235</sub> Val Ala Leu Ile Leu<sub>240</sub>  
 50 Asn Cys His His<sub>245</sub> Ala Ser Ala Val<sub>250</sub> Ala Ala  
 55 <210> 23  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 <400> 23  
 60 Lys Glu Phe Thr Leu<sub>5</sub> Asp Phe Ser Thr Ala<sub>10</sub> Lys Thr Tyr Val<sub>15</sub> Asp Ser  
 65 Leu Asn Val<sub>20</sub> Ile Arg Ser Ala Ile Gly<sub>25</sub> Thr Pro Leu Gln Thr<sub>30</sub> Ile Ser  
 70 Ser Gly Gly<sub>35</sub> Thr Ser Leu Leu Met<sub>40</sub> Ile Asp Ser Gly Thr<sub>45</sub> Gly Asp Asn  
 75 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg<sub>55</sub> Gly Ile Asp Pro Glu<sub>60</sub> Glu Gly Arg Phe

ES 2 919 749 T3

Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 5 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90  
 10 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 15 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 20 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  
 25 Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 30 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 35 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 40 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  
 225 230 235 240  
 45 Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala  
 245 250  
 50 <210> 24  
 <211> 250  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 <400> 24  
 60 Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 65 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



ES 2 919 749 T3

Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 25 30  
 5 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn  
 35 40 45  
 10 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 15 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 20 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  
 25 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 30 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser  
 130 135 140  
 35 His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
 40 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  
 45 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 50 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220  
 55 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 60 Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Ala Met Ala Ser Asp Glu  
 245 250 255  
 Phe Pro Ser Met Cys  
 260  
 65 <210> 26  
 <211> 261  
 <212> PRT

ES 2 919 749 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 26

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

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

35 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn  
40 45 50

55 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
60 65

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

225 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
230 235 240

245 Asn Cys His His His Ala Ser Arg Val Ala Ala Met Ala Ser Asp Glu

ES 2 919 749 T3

245 250 255

5 Phe Pro Ser Met Cys  
260

10 <210> 27  
<211> 260  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 27  
Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser  
1 5 10 15

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

30 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn  
35 40 45

35 Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe  
50 55 60

40 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
65 70 75 80

45 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser  
85 90 95

50 His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser  
100 105 110

55 Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met  
115 120 125

60 Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu  
130 135 140

65 Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg  
145 150 155 160

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

75 Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr  
180 185 190

80 Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val  
195 200 205

ES 2 919 749 T3

Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser  
 210 215 220  
 5 Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn  
 225 230 235 240  
 10 Cys His Ser Thr Gly Ser Tyr Ser Val Ala Ser Val Ser Gln Lys Gln  
 245 250 255  
 15 Lys Thr Glu Cys  
 260  
 <210> 28  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 <400> 28  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 30 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 25 30  
 35 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn  
 35 40 45  
 40 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 45 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 50 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 55 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 60 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 65 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser  
 130 135 140  
 70 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

ES 2 919 749 T3

5 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 10 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 15 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220  
 20 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 25 Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu  
 245 250 255  
 30 Phe Pro Ser Met Cys  
 260  
 <210> 29  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 <400> 29  
 40 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 45 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 25 30  
 50 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn  
 35 40 45  
 55 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 60 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 65 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 70 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 75 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125

ES 2 919 749 T3

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

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

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

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

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

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

30 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240

35 Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Arg Met Ala Ser Asp Glu  
 245 250 255

Phe Pro Ser Met Cys  
 260

<210> 30  
 <211> 260  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 30  
 Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15

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

55 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn  
 35 40 45

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

65 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
 65 70 75 80

Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser

ES 2 919 749 T3

				85					90					95		
5	His	Ile	Ser	Val	Pro	Asp	Val	Ile	Thr	Val	Ser	Met	Thr	Thr	Asp	Ser
				100					105					110		
10	Ser	Tyr	Ser	Ser	Leu	Gln	Arg	Ile	Ala	Asp	Leu	Glu	Arg	Thr	Gly	Met
			115					120					125			
15	Gln	Ile	Gly	Arg	His	Ser	Leu	Val	Gly	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Met	Glu
		130					135					140				
20	Phe	Arg	Gly	Arg	Ser	Met	Thr	Arg	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Met	Leu	Arg
	145					150					155					160
25	Phe	Val	Thr	Val	Ile	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile	Gln	Arg
					165					170					175	
30	Gly	Phe	Arg	Pro	Ala	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Pro	Leu	Tyr	Thr	Met	Thr
				180					185					190		
35	Ala	Gln	Asp	Val	Asp	Leu	Thr	Leu	Asn	Trp	Gly	Arg	Ile	Ser	Asn	Val
			195					200					205			
40	Leu	Pro	Glu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Val	Arg	Ile	Gly	Arg	Ile	Ser
		210					215					220				
45	Phe	Asn	Ser	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	Ala	Val	Ile	Leu	Asn
	225					230					235					240
50	Cys	His	Ser	Thr	Gly	Ser	Ala	Ser	Val	Arg	Ser	Val	Ser	Gln	Lys	Gln
					245					250					255	
55	Lys	Thr	Glu	Cys												
				260												
60	<210>	31														
	<211>	261														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
65	<220>															
	<221>	fuelle														
	<223>	/nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"														
70	<400>	31														
	Lys	Glu	Phe	Thr	Leu	Asp	Phe	Ser	Thr	Ala	Lys	Thr	Tyr	Val	Asp	Ser
	1				5					10					15	
75	Leu	Asn	Val	Ile	Arg	Ser	Ala	Ile	Gly	Thr	Pro	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser
				20					25					30		
80	Ser	Gly	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Met	Ile	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Asn
			35					40					45			

ES 2 919 749 T3

Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 5  
 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 10 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 15 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 20 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  
 25 His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
 30 Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 35 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 40 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  
 45 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 50 Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Met Ala Ser Asp Glu  
 245 250 255  
 55 Phe Pro Ser Met Cys  
 260

<210> 32  
 <211> 261  
 60 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 65 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 <400> 32  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser



ES 2 919 749 T3

<211> 260  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 33  
 10 Asp Glu Phe Thr Val Asp Phe Ser Ser Gln Lys Ser Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 15 Leu Asn Ser Ile Arg Ser Ala Ile Ser Thr Pro Leu Gly Asn Ile Ser  
 20 25 30  
 20 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn  
 35 40 45  
 25 Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe  
 50 55 60  
 30 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
 65 70 75 80  
 35 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 40 His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser  
 100 105 110  
 45 Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 50 Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu  
 130 135 140  
 55 Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
 60 Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 65 Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr  
 180 185 190  
 Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val  
 195 200 205  
 Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser  
 210 215 220  
 70 Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn  
 225 230 235 240

ES 2 919 749 T3

Cys His Ser Thr Gly Ser Ala Ser Val Ala Ser Val Ser Gln Lys Gln  
 245 250 255

5 Lys Thr Glu Cys  
 260

10 <210> 34  
 <211> 257  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 34  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

80 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser

ES 2 919 749 T3

195 200 205

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

10 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
225 230 235 240

15 Asn Cys His His His Ala Ser Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met  
245 250 255

20 <210> 35  
<211> 257  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

25 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

30 <400> 35  
Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 919 749 T3

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 5 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 10 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 15 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220  
 20 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 25 Asn Cys His His His Ala Ser Met Ala Ser Asp Glu Phe Pro Ser Met  
 245 250 255  
 30 <210> 36  
 <211> 256  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 40 <400> 36  
 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  
 50 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn  
 35 40 45  
 55 Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe  
 50 55 60  
 60 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
 65 70 75 80  
 65 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 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 2 919 749 T3

His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 5 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 10 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser  
 130 135 140  
 15 His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
 20 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  
 25 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 30 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220  
 35 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 40 Asn Cys His His His Ala Ser  
 245  
 <210> 38  
 <211> 247  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 50 <400> 38  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 55 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 25 30  
 60 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn  
 35 40 45  
 65 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



ES 2 919 749 T3

Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe  
 50 55 60  
 5  
 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
 65 70 75 80  
 10 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 15 His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser  
 100 105 110  
 20 Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu  
 130 135 140  
 25 Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
 30 Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 35 Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr  
 180 185 190  
 40 Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val  
 195 200 205  
 Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser  
 210 215 220  
 45 Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn  
 225 230 235 240  
 50 Cys His Ser Thr Gly Ser  
 245  
 55 <210> 40  
 <211> 243  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 60 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 65 <400> 40  
 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

ES 2 919 749 T3

		20		25		30										
5	Ser	Gly	Gly	Thr	Ser	Leu	Leu	Met	Ile	Asp	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Asn
			35					40				45				
10	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Val	Arg	Gly	Ile	Asp	Pro	Glu	Glu	Gly	Arg	Phe
		50					55					60				
15	Asn	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Val	Glu	Arg	Asn	Asn	Leu	Tyr	Val	Thr	Gly
	65					70					75					80
20	Phe	Val	Asn	Arg	Thr	Asn	Asn	Val	Phe	Tyr	Arg	Phe	Ala	Asp	Phe	Ser
					85					90					95	
25	His	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp	Ser
			100						105					110		
30	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	Gln	Arg	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Thr	Gly	Met
			115					120					125			
35	Gln	Ile	Asn	Arg	His	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Met	Ser
		130					135					140				
40	His	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Val	Ala	Arg	Ala	Met	Leu	Arg
	145					150					155					160
45	Phe	Val	Thr	Val	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile	Gln	Arg
					165					170					175	
50	Gly	Phe	Arg	Thr	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr	Val	Met
				180					185					190		
55	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Leu	Thr	Leu	Asn	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Ser
			195					200					205			
60	Val	Leu	Pro	Asp	Tyr	His	Gly	Gln	Asp	Ser	Val	Arg	Val	Gly	Arg	Ile
		210					215					220				
65	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	Ala	Leu	Ile	Leu
	225					230					235					240
70	Asn	Cys	His													
75	<210>	41														
	<211>	243														
	<212>	PRT														
	<213>	Secuencia Artificial														
80	<220>															
	<221>	fuentes														
	<223>	/nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"														



ES 2 919 749 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 42

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

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

20 Gln Gly Gly Val Ser Val Ser Val Ile Asn His Val Leu Gly Gly Asn  
35 40 45

25 Tyr Ile Ser Leu Asn Val Arg Gly Leu Asp Pro Tyr Ser Glu Arg Phe  
50 55 60

30 Asn His Leu Arg Leu Ile Met Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Ala Gly  
65 70 75 80

35 Phe Ile Asn Thr Glu Thr Asn Ile Phe Tyr Arg Phe Ser Asp Phe Ser  
85 90 95

40 His Ile Ser Val Pro Asp Val Ile Thr Val Ser Met Thr Thr Asp Ser  
100 105 110

45 Ser Tyr Ser Ser Leu Gln Arg Ile Ala Asp Leu Glu Arg Thr Gly Met  
115 120 125

50 Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu Asp Leu Met Glu  
130 135 140

55 Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg  
145 150 155 160

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

65 Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr  
180 185 190

70 Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val  
195 200 205

75 Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser  
210 215 220

80 Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn  
225 230 235 240

Cys His

5 <210> 43  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
  
 <400> 43  
 15 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
  
 20 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 20 25 30  
  
 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn  
 35 35 40 45  
  
 25 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
  
 30 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
  
 35 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90 95  
  
 40 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  
  
 45 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser  
 130 135 140  
  
 50 His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
  
 55 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  
  
 60 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
  
 65 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220

ES 2 919 749 T3

Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240

5  
 Asn

10  
 <210> 44  
 <211> 241  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20  
 <400> 44  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15

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

30  
 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn  
 35 40 45

35  
 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60

40  
 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80

45  
 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90 95

50  
 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110

55  
 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125

60  
 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser  
 130 135 140

65  
 His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160

70  
 Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175

75  
 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190

80  
 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205

ES 2 919 749 T3

5 Val<sub>210</sub> Leu Pro Asp Tyr His Gly<sub>215</sub> Gln Asp Ser Val Arg<sub>220</sub> Val Gly Arg Ile

10 Ser<sub>225</sub> Phe Gly Ser Ile Asn<sub>230</sub> Ala Ile Leu Gly<sub>235</sub> Ser Val Ala Leu Ile Leu<sub>240</sub>

15 <210> 45  
<211> 240  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

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

25 <400> 45  
Asp<sub>1</sub> Glu Phe Thr Val<sub>5</sub> Asp Phe Ser Ser Gln<sub>10</sub> Lys Ser Tyr Val<sub>15</sub> Asp Ser

30 Leu Asn Ser Ile<sub>20</sub> Arg Ser Ala Ile Ser<sub>25</sub> Thr Pro Leu Gly<sub>30</sub> Asn Ile Ser

35 Gln Gly Gly<sub>35</sub> Val Ser Val Ser Val<sub>40</sub> Ile Asn His Val<sub>45</sub> Leu Gly Gly Asn

40 Tyr Ile<sub>50</sub> Ser Leu Asn Val Arg<sub>55</sub> Gly Leu Asp Pro Tyr<sub>60</sub> Ser Glu Arg Phe

45 Asn His Leu Arg Leu Ile<sub>70</sub> Met Glu Arg Asn<sub>75</sub> Asn Leu Tyr Val Ala Gly<sub>80</sub>

50 Phe Ile Asn Thr Glu<sub>85</sub> Thr Asn Ile Phe Tyr<sub>90</sub> Arg Phe Ser Asp Phe<sub>95</sub> Ser

55 His Ile Ser Val<sub>100</sub> Pro Asp Val Ile Thr Val<sub>105</sub> Ser Met Thr Thr<sub>110</sub> Asp Ser

60 Ser Tyr Ser<sub>115</sub> Ser Leu Gln Arg Ile<sub>120</sub> Ala Asp Leu Glu Arg<sub>125</sub> Thr Gly Met

65 Gln Ile Gly Arg His Ser Leu Val Gly Ser Tyr Leu<sub>140</sub> Asp Leu Met Glu

70 Phe Arg Gly Arg Ser Met<sub>150</sub> Thr Arg Ala Ser Ser<sub>155</sub> Arg Ala Met Leu Arg<sub>160</sub>

75 Phe Val Thr Val Ile<sub>165</sub> Ala Glu Ala Leu Arg<sub>170</sub> Phe Arg Gln Ile Gln<sub>175</sub> Arg

ES 2 919 749 T3

Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr  
 180 185 190

5 Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val  
 195 200 205

10 Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser  
 210 215 220

15 Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu Asn  
 225 230 235 240

<210> 46  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 46

30 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

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

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

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

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

55 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

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

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

ES 2 919 749 T3

Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 5 Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val Met  
 180 185 190  
 10 Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser Ser  
 195 200 205  
 15 Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg Ile  
 210 215 220  
 20 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 25 <210> 47  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 35 <400> 47  
 Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 40 Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile Ser  
 20 25 30  
 45 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp Asn  
 35 40 45  
 50 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 55 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 60 Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe Ser  
 85 90 95  
 65 His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp Ser  
 100 105 110  
 70 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125  
 75 Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met Ser  
 130 135 140  
 80 His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu Arg



ES 2 919 749 T3

5 Phe Arg Gly Arg Ser Met Thr Arg Ala Ser Ser Arg Ala Met Leu Arg  
 145 150 155 160  
 Phe Val Thr Val Ile Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln Arg  
 165 170 175  
 10 Gly Phe Arg Pro Ala Leu Ser Glu Ala Ser Pro Leu Tyr Thr Met Thr  
 180 185 190  
 15 Ala Gln Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Ile Ser Asn Val  
 195 200 205  
 20 Leu Pro Glu Tyr Arg Gly Glu Glu Gly Val Arg Ile Gly Arg Ile Ser  
 210 215 220  
 25 Phe Asn Ser Leu Ser Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Val Ile Leu  
 225 230 235  
 <210> 49  
 <211> 273  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 35  
 <400> 49  
 40 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  
 45 Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp Asn  
 35 40 45  
 50 Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg Phe  
 50 55 60  
 55 Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr Gly  
 65 70 75 80  
 60 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  
 65 Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly Met  
 115 120 125

ES 2 919 749 T3

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

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

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

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

20 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

25 Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240

30 Asn Pro Ala Asp Gly Arg Val Arg Gly Ile Thr His Asn Lys Ile Leu  
 245 250 255

35 Trp Asp Ser Ser Thr Leu Gly Ala Ile Leu Met Arg Arg Thr Ile Ser  
 260 265 270

Ser

40

<210> 50  
 <211> 513  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia Artificial

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

50

<400> 50  
 Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp  
 1 5 10 15

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

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

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

ES 2 919 749 T3

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

ES 2 919 749 T3

Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Gln Leu  
 340 345 350

5 Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser  
 355 360 365

10 Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Val Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala  
 370 375 380

15 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys  
 385 390 395 400

20 Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr  
 405 410 415

25 Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala  
 420 425 430 435

30 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser  
 435 440 445

35 Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val  
 450 455 460

40 Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr  
 465 470 475 480

45 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 485 490 495

50 Trp Ile Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu  
 500 505 510

55 Lys

50 <210> 51  
 <211> 512  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

60 <400> 51  
 Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp  
 1 5 10 15

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

Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp

ES 2 919 749 T3

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



ES 2 919 749 T3

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

ES 2 919 749 T3

5 Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile  
 305 310 315 320

10 Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys  
 325 330 335

15 Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu  
 340 345 350

20 Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser  
 355 360 365

25 Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr  
 370 375 380

30 Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly  
 385 390 395 400

35 Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro  
 405 410 415

40 Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg  
 420 425 430

45 Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly  
 435 440 445

50 Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
 450 455 460

55 Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
 465 470 475 480

60 Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 485 490 495

65 Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
 500 505 510

60 <210> 53  
 <211> 522  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

ES 2 919 749 T3

<400> 53  
 Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp  
 1 5 10 15  
 5 Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile  
 20  
 10 Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Ser Gly Asp  
 35 40 45  
 15 Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg  
 50  
 20 Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr  
 65 70 75 80  
 25 Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe  
 85 90 95  
 30 Ser His Val Thr Phe Pro Gly Thr Thr Ala Val Thr Leu Ser Gly Asp  
 100 105 110  
 35 Ser Ser Tyr Thr Thr Leu Gln Arg Val Ala Gly Ile Ser Arg Thr Gly  
 115 120 125  
 40 Met Gln Ile Asn Arg His Ser Leu Thr Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Met  
 130 135 140  
 45 Ser His Ser Gly Thr Ser Leu Thr Gln Ser Val Ala Arg Ala Met Leu  
 145 150 155 160  
 50 Arg Phe Val Thr Val Thr Ala Glu Ala Leu Arg Phe Arg Gln Ile Gln  
 165 170 175  
 55 Arg Gly Phe Arg Thr Thr Leu Asp Asp Leu Ser Gly Arg Ser Tyr Val  
 180 185 190  
 60 Met Thr Ala Glu Asp Val Asp Leu Thr Leu Asn Trp Gly Arg Leu Ser  
 195 200 205  
 65 Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg  
 210 215 220  
 Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile  
 225 230 235 240  
 Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys  
 245 250 255  
 70 Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Gly Ile Leu Gly  
 260 265 270

ES 2 919 749 T3

Phe Val Phe Thr Leu Met Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu  
 275 280 285  
 5  
 Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly  
 290 295 300  
 10  
 Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Val His Trp Val Lys Gln Thr Pro Gly  
 305 310 315  
 15  
 Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr  
 325 330 335  
 20  
 Ser Phe Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys  
 340 345 350  
 25  
 Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp  
 355 360 365  
 30  
 Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr  
 370 375 380  
 35  
 Val Trp Phe Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
 385 390 395  
 40  
 Ser Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser  
 405 410 415  
 45  
 Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly  
 420 425 430  
 50  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 435 440 445  
 55  
 Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr  
 450 455 460  
 60  
 Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
 465 470 475 480  
 65  
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu  
 485 490 495  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ile Ser Asn Pro Pro Thr  
 500 505 510  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 515 520  
 <210> 54  
 <211> 384  
 <212> PRT

ES 2 919 749 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 54

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

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

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

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

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

35 Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

65 Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile  
225 230 235 240

ES 2 919 749 T3

Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala His His Ser Glu  
 245 250 255  
 5 Asp Pro Ser Ser Lys Ala Pro Lys Ala Pro Glu Val Gln Leu Val Glu  
 260 265 270  
 10 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys  
 275 280 285  
 15 Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Ile Asn Thr Met Gly Trp Tyr Arg  
 290 295 300  
 20 Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Leu Ile Ser Ser Ile  
 305 310 315 320  
 25 Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
 325 330 335  
 30 Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys  
 340 345 350  
 35 Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Arg Phe Arg Thr Ala Ala  
 355 360 365  
 40 Gln Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 370 375 380  
 <210> 55  
 <211> 369  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 45  
 <400> 55  
 Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp  
 1 5 10 15  
 50 Ser Leu Asn Val Ile Arg Ser Ala Ile Gly Thr Pro Leu Gln Thr Ile  
 20 25 30  
 55 Ser Ser Gly Gly Thr Ser Leu Leu Met Ile Asp Ser Gly Thr Gly Asp  
 35 40 45  
 60 Asn Leu Phe Ala Val Asp Val Arg Gly Ile Asp Pro Glu Glu Gly Arg  
 50 55 60  
 65 Phe Asn Asn Leu Arg Leu Ile Val Glu Arg Asn Asn Leu Tyr Val Thr  
 65 70 75 80  
 Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe

ES 2 919 749 T3

	85					90					95					
5	Ser	His	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Thr	Leu	Ser	Gly	Asp
				100					105					110		
10	Ser	Ser	Tyr	Thr	Thr	Leu	Gln	Arg	Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Thr	Gly
			115					120					125			
15	Met	Gln	Ile	Asn	Arg	His	Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Tyr	Leu	Asp	Leu	Met
		130					135					140				
20	Ser	His	Ser	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Gln	Ser	Val	Ala	Arg	Ala	Met	Leu
	145					150					155				160	
25	Arg	Phe	Val	Thr	Val	Thr	Ala	Glu	Ala	Leu	Arg	Phe	Arg	Gln	Ile	Gln
					165					170					175	
30	Arg	Gly	Phe	Arg	Thr	Thr	Leu	Asp	Asp	Leu	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr	Val
				180					185					190		
35	Met	Thr	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Leu	Thr	Leu	Asn	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser
			195					200					205			
40	Ser	Val	Leu	Pro	Asp	Tyr	His	Gly	Gln	Asp	Ser	Val	Arg	Val	Gly	Arg
		210					215					220				
45	Ile	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly	Ser	Val	Ala	Leu	Ile
	225					230					235					240
50	Leu	Asn	Cys	His	His	His	Ala	Ser	Ala	Val	Ala	Ala	Glu	Phe	Pro	Lys
					245					250					255	
55	Pro	Ser	Thr	Pro	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Ala	Pro	Ala	Ser	Val	Ser
				260					265					270		
60	Asp	Val	Pro	Arg	Asp	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Pro	Thr	Ser	Leu
			275					280					285			
65	Leu	Ile	Ser	Trp	Cys	Arg	Gln	Arg	Cys	Ala	Asp	Ser	Tyr	Arg	Ile	Thr
		290					295					300				
70	Tyr	Gly	Glu	Thr	Gly	Gly	Asn	Ser	Pro	Val	Gln	Glu	Phe	Thr	Val	Pro
	305					310					315					320
75	Gly	Ser	Trp	Lys	Thr	Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Val	Asp
					325					330					335	
80	Tyr	Thr	Ile	Thr	Val	Tyr	Val	Val	Thr	His	Tyr	Tyr	Gly	Trp	Asp	Arg
				340					345					350		
85	Tyr	Ser	His	Pro	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Thr	Gly	Ser	Lys	Asp	Glu

ES 2 919 749 T3

355 360 365

5 Leu

10 <210> 56  
 <211> 405  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

20 <400> 56  
 Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp  
 1 5 10 15

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

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

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

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

45 Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe  
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 919 749 T3

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

5 Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile  
 225 230 235

10 Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys  
 245 250 255

15 Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Ala Pro Thr Ser  
 260 265 270

20 Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp  
 275 280 285

25 Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu  
 290 295 300

30 Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu  
 305 310 315 320

35 Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp  
 340 345 350

40 Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu  
 355 360 365

45 Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu  
 370 375 380

50 Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu  
 385 390 395 400

55 <210> 57  
 <211> 508  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

65 <400> 57  
 Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp  
 1 5 10 15

ES 2 919 749 T3

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

ES 2 919 749 T3

Ile Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asn Arg Leu Ala Trp Tyr  
 290 295 300

5 Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile Ser Gly Ala Thr  
 305 310 315 320

10 Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 325 330 335

15 Lys Asp Tyr Thr Leu Ser Ile Thr Ser Leu Gln Thr Glu Asp Val Ala  
 340 345 350

20 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Thr Phe Gly Gly Gly  
 355 360 365

25 Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly  
 370 375 380

30 Ser Gly Glu Gly Ser Lys Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu  
 385 390 395 400

35 Val Gln Pro Ser Gln Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe  
 405 410 415

40 Ser Leu Ile Ser Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys  
 420 425 430 435

45 Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr  
 435 440 445

50 Asn Ala Ala Phe Met Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys  
 450 455 460

55 Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala  
 465 470 475 480

Ile Tyr Phe Cys Ala Lys Thr Leu Ile Thr Thr Gly Tyr Ala Met Asp  
 485 490 495

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 500 505

<210> 58  
 <211> 512  
 <212> PRT  
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 65

<400> 58  
 Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp  
 1 5 10 15

ES 2 919 749 T3

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

ES 2 919 749 T3

5 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala Trp Tyr  
 290 295 300  
 10 Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser  
 305 310 315 320  
 15 Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly  
 325 330 335  
 20 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala  
 340 345 350  
 25 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln  
 355 360 365  
 30 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly  
 370 375 380  
 35 Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
 385 390 395 400  
 40 Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala  
 405 410 415  
 45 Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala  
 420 425 430  
 50 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly  
 435 440 445  
 55 Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala  
 450 455 460  
 60 Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala  
 465 470 475 480  
 65 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe  
 485 490 495  
 70 Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 500 505 510  
 75 <210> 59  
 <211> 516  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 80 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"



ES 2 919 749 T3

Thr Gln Ala Ala Pro Ser Ile Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser  
 275 280 285  
 5  
 Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Asn Ser Asn Gly Asn Thr  
 290 295 300  
 10  
 Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu  
 305 310 315 320  
 15  
 Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 325 330 335  
 20  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu  
 340 345 350  
 25  
 Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro  
 355 360 365  
 30  
 Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Gly Ser Thr Ser  
 370 375 380  
 35  
 Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Glu Val Gln Leu Gln  
 385 390 395 400  
 40  
 Gln Ser Gly Pro Glu Leu Ile Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser  
 405 410 415  
 45  
 Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val  
 420 425 430  
 50  
 Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro  
 435 440 445  
 55  
 Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr  
 450 455 460  
 60  
 Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser  
 465 470 475 480  
 65  
 Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Thr Tyr  
 485 490 495  
 Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu  
 500 505 510  
 Thr Val Ser Ser  
 515  
 <210> 60  
 <211> 518  
 <212> PRT

ES 2 919 749 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

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

<400> 60

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

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

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

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

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

35 Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

75 Ile Ser Phe Gly Ser Ile Asn Ala Ile Leu Gly Ser Val Ala Leu Ile  
225 230 235 240

ES 2 919 749 T3

Leu Asn Cys His His His Ala Ser Ala Val Ala Ala Glu Phe Pro Lys  
 245 250 255  
 5 Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro Asp Ile Gln Leu  
 260 265 270  
 10 Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly Gln Pro Ala Ser  
 275 280 285  
 15 Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly Asn Thr  
 290 295 300  
 20 Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu  
 305 310 315 320  
 25 Ile Tyr Thr Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 325 330 335  
 30 Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Ser His Val Pro  
 355 360 365  
 35 Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Ser Thr Ser  
 370 375 380  
 40 Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Gln Val  
 385 390 395 400  
 45 Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val  
 405 410 415  
 50 Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Val  
 420 425 430 435  
 55 Asn Trp Ile Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Met Gly Trp  
 435 440 445  
 Ile Asn Pro Asn Thr Gly Glu Pro Thr Phe Asp Asp Asp Phe Lys Gly  
 450 455 460  
 60 Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln  
 465 470 475 480  
 65 Ile Ser Ser Leu Lys Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ser Arg  
 485 490 495  
 Ser Arg Gly Lys Asn Glu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 500 505 510

ES 2 919 749 T3

Leu Val Thr Val Ser Ser  
515

- 5 <210> 61
- <211> 403
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

15 <400> 61  
Met Lys Glu Phe Thr Leu Asp Phe Ser Thr Ala Lys Thr Tyr Val Asp  
1 5 10 15

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

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

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

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

40 Gly Phe Val Asn Arg Thr Asn Asn Val Phe Tyr Arg Phe Ala Asp Phe  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

80 Ser Val Leu Pro Asp Tyr His Gly Gln Asp Ser Val Arg Val Gly Arg

ES 2 919 749 T3

	210		215		220														
5	Ile 225	Ser	Phe	Gly	Ser	Ile 230	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly 235	Ser	Val	Ala	Leu	Ile 240			
10	Leu	Asn	Cys	His	His 245	His	Ala	Ser	Ala	Val 250	Ala	Ala	Glu	Phe	Pro 255	Lys			
15	Pro	Ser	Thr	Pro 260	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly 265	Gly	Ala	Pro	Arg	Gly 270	Ser	His			
20	His	His	His 275	His	His	Gly	Ser	Asp 280	Leu	Gly	Lys	Lys	Leu 285	Leu	Glu	Ala			
25	Ala	Arg 290	Ala	Gly	Gln	Asp	Asp 295	Glu	Val	Arg	Ile	Leu 300	Met	Ala	Asn	Gly			
30	Ala	Asp	Val	Asn	Ala	Lys 310	Asp	Glu	Tyr	Gly	Leu 315	Thr	Pro	Leu	Tyr	Leu 320			
35	Ala	Thr	Ala	His	Gly 325	His	Leu	Glu	Ile	Val 330	Glu	Val	Leu	Leu	Lys 335	Asn			
40	Gly	Ala	Asp	Val 340	Asn	Ala	Val	Asp	Ala 345	Ile	Gly	Phe	Thr	Pro 350	Leu	His			
45	Leu	Ala	Ala 355	Phe	Ile	Gly	His	Leu 360	Glu	Ile	Ala	Glu	Val 365	Leu	Leu	Lys			
50	His	Gly 370	Ala	Asp	Val	Asn	Ala 375	Gln	Asp	Lys	Phe	Gly 380	Lys	Thr	Ala	Phe			
55	Asp 385	Ile	Ser	Ile	Gly	Asn 390	Gly	Asn	Glu	Asp	Leu 395	Ala	Glu	Ile	Leu	Gln 400			
60	Lys	Leu	Asn																
65	<210>	62																	
	<211>	4																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Desconocido																	
	<220>																		
	<221>	fuerate																	
	<223>	/nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"																	
	<400>	62																	
	Lys	Asp	Glu	Leu															
	1																		
	<210>	63																	

<211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

10 <400> 63  
 His Asp Glu Phe  
 1

15 <210> 64  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

25 <400> 64  
 His Asp Glu Leu  
 1

30 <210> 65  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

40 <400> 65  
 Arg Asp Glu Phe  
 1

45 <210> 66  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

50 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

55 <400> 66  
 Arg Asp Glu Leu  
 1

60 <210> 67  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

65

5 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
retención/recuperación del retículo endoplasmático"

10 <400> 67  
Trp Asp Glu Leu  
1

15 <210> 68  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

20 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
retención/recuperación del retículo endoplasmático"

25 <400> 68  
Tyr Asp Glu Leu  
1

30 <210> 69  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

35 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
retención/recuperación del retículo endoplasmático"

40 <400> 69  
His Glu Glu Phe  
1

45 <210> 70  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

50 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
retención/recuperación del retículo endoplasmático"

55 <400> 70  
His Glu Glu Leu  
1

60 <210> 71  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

65 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
retención/recuperación del retículo endoplasmático"

5 <400> 71  
Lys Glu Glu Leu  
1

10 <210> 72  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

15 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

20 <400> 72  
Arg Glu Glu Leu  
1

25 <210> 73  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

30 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

35 <400> 73  
Lys Ala Glu Leu  
1

40 <210> 74  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

45 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

50 <400> 74  
Lys Cys Glu Leu  
1

55 <210> 75  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

60 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

65 <400> 75  
Lys Phe Glu Leu

1

5 <210> 76  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

15 <400> 76  
 Lys Gly Glu Leu  
 1

20 <210> 77  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

30 <400> 77  
 Lys His Glu Leu  
 1

35 <210> 78  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

40 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

45 <400> 78  
 Lys Leu Glu Leu  
 1

50 <210> 79  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

55 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

60 <400> 79  
 Lys Asn Glu Leu  
 1

<210> 80

<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

5 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

10 <400> 80  
Lys Gln Glu Leu  
1

15 <210> 81  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

20 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

25 <400> 81  
Lys Arg Glu Leu  
1

30 <210> 82  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

35 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

40 <400> 82  
Lys Ser Glu Leu  
1

45 <210> 83  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

50 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

55 <400> 83  
Lys Val Glu Leu  
1

60 <210> 84  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

65

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 5 retención/recuperación del retículo endoplasmático"  
  
 <400> 84  
 Lys Trp Glu Leu  
 10 1  
  
 <210> 85  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 15 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 20 retención/recuperación del retículo endoplasmático"  
  
 <400> 85  
 Lys Tyr Glu Leu  
 25 1  
  
 <210> 86  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 30 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 35 retención/recuperación del retículo endoplasmático"  
  
 <400> 86  
 Lys Glu Asp Leu  
 40 1  
  
 <210> 87  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 45 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 50 retención/recuperación del retículo endoplasmático"  
  
 <400> 87  
 Lys Ile Glu Leu  
 55 1  
  
 <210> 88  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 60 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 65 retención/recuperación del retículo endoplasmático"

5 <400> 88  
Asp Lys Glu Leu  
1

10 <210> 89  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

15 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

20 <400> 89  
Phe Asp Glu Leu  
1

25 <210> 90  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

30 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

35 <400> 90  
Lys Asp Glu Phe  
1

40 <210> 91  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

45 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

50 <400> 91  
Lys Lys Glu Leu  
1

55 <210> 92  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

60 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

65 <400> 92  
His Ala Asp Leu

1

5 <210> 93  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

10 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

15 <400> 93  
 His Ala Glu Leu  
 1

20 <210> 94  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

30 <400> 94  
 His Ile Glu Leu  
 1

35 <210> 95  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

40 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

45 <400> 95  
 His Asn Glu Leu  
 1

50 <210> 96  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

55 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

60 <400> 96  
 His Thr Glu Leu  
 1

<210> 97

<211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

10 <400> 97  
 Lys Thr Glu Leu  
 1

15 <210> 98  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

25 <400> 98  
 His Val Glu Leu  
 1

30 <210> 99  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

40 <400> 99  
 Asn Asp Glu Leu  
 1

45 <210> 100  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

50 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

55 <400> 100  
 Gln Asp Glu Leu  
 1

60 <210> 101  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

65

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 5 retención/recuperación del retículo endoplasmático"

<400> 101  
 Arg Glu Asp Leu  
 10 1

<210> 102  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 15 <213> Desconocido

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 20 retención/recuperación del retículo endoplasmático"

<400> 102  
 Arg Asn Glu Leu  
 25 1

<210> 103  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 30 <213> Desconocido

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 35 retención/recuperación del retículo endoplasmático"

<400> 103  
 Arg Thr Asp Leu  
 40 1

<210> 104  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 45 <213> Desconocido

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 50 retención/recuperación del retículo endoplasmático"

<400> 104  
 Arg Thr Glu Leu  
 55 1

<210> 105  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 60 <213> Desconocido

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de  
 65 retención/recuperación del retículo endoplasmático"

5 <400> 105  
Ser Asp Glu Leu  
1

10 <210> 106  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

15 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

20 <400> 106  
Thr Asp Glu Leu  
1

25 <210> 107  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Desconocido

30 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

35 <400> 107  
Ser Lys Glu Leu  
1

40 <210> 108  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

45 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
peptide"

50 <400> 108  
Arg Val Lys Arg  
1

55 <210> 109  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Desconocido

60 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

65 <400> 109  
Ala Leu Glu Asp Glu Leu  
1 5

5 <210> 110  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

<220>  
 <221> fuente  
 10 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

15 <400> 110  
 His Ala Glu Asp Glu Leu  
 1 5

20 <210> 111  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

30 <400> 111  
 His Leu Glu Asp Glu Leu  
 1 5

35 <210> 112  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

40 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

45 <400> 112  
 Lys Leu Glu Asp Glu Leu  
 1 5

50 <210> 113  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido

55 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"

60 <400> 113  
 Ile Arg Ser Asp Glu Leu  
 1 5

65 <210> 114  
 <211> 6

<212> PRT  
 <213> Desconocido  
  
 <220>  
 5 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"  
  
 10 <400> 114  
 Glu Arg Ser Thr Glu Leu  
 1 5  
  
 15 <210> 115  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Desconocido  
  
 20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de desconocido: Péptido del motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático"  
  
 25 <400> 115  
 Arg Pro Ser Thr Glu Leu  
 1 5  
  
 30 <210> 116  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
  
 40 <400> 116  
 Ala Met Gly Arg Ser Gly Gly Gly Cys Ala Gly Asn Arg Val Gly Ser  
 1 5 10 15  
  
 45 Ser Leu Ser Cys Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ala Met  
 20 25  
  
 50 <210> 117  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 55 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
  
 60 <400> 117  
 Ala Ser Gly Gly Pro Glu  
 1 5  
  
 65 <210> 118  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

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

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (5)..(6)  
 <223> /sustituir=" "  
 10

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (10)..(11)  
 <223> /sustituir=" "  
 15

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (15)..(16)  
 <223> /sustituir=" "  
 20

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (20)..(21)  
 <223> /sustituir=" "  
 25

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (25)..(26)  
 <223> /sustituir=" "  
 30

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (30)..(31)  
 <223> /sustituir=" "  
 35

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (35)..(36)  
 <223> /sustituir=" "  
 40

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (40)..(41)  
 <223> /sustituir=" "  
 45

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (45)..(46)  
 <223> /sustituir=" "  
 50

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (50)..(51)  
 <223> /sustituir=" "  
 55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(54)  
 <223> /nota="Los residuos variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para las posiciones variantes"  
 60

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (3)..(52)  
 <223> /nota="Esta región puede abarcar de 1 a 10 unidades de repetición'Gly Gly Gly Ser', en la que algunas posiciones pueden estar ausentes"  
 65

<220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="véase la memoria tal como se presentó para una descripción  
 5 detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"  
 <400> 118  
 Ala Met Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 10 1 5 10 15  
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 15 20 25 30  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 35 40 45  
 20 Gly Gly Gly Ser Ala Met  
 50  
 <210> 119  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"  
 30  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (2)..(6)  
 <223> /sustituir=" "  
 35  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9)..(13)  
 <223> /sustituir=" "  
 40  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> /sustituir=" "  
 45  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (23)..(27)  
 <223> /sustituir=" "  
 50  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (30)..(34)  
 <223> /sustituir=" "  
 55  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (37)..(41)  
 <223> /sustituir=" "  
 60  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (44)..(48)  
 <223> /sustituir=" "  
 65

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (51)..(55)  
 <223> /sustituir=" "  
 5  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (58)..(62)  
 <223> /sustituir=" "  
 10  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (65)..(69)  
 <223> /sustituir=" "  
 15  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (72)..(76)  
 <223> /sustituir=" "  
 20  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (79)..(83)  
 <223> /sustituir=" "  
 25  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (86)..(90)  
 <223> /sustituir=" "  
 30  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (93)..(97)  
 <223> /sustituir=" "  
 35  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (100)..(104)  
 <223> /sustituir=" "  
 40  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (107)..(111)  
 <223> /sustituir=" "  
 45  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (114)..(118)  
 <223> /sustituir=" "  
 50  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (121)..(125)  
 <223> /sustituir=" "  
 55  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (128)..(132)  
 <223> /sustituir=" "  
 60  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (135)..(139)  
 <223> /sustituir=" "  
 65  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (142)..(146)

```

<223> /sustituir=" "
<220>
<221> VARIANTE
5 <222> (149)..(153)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> VARIANTE
10 <222> (156)..(160)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> VARIANTE
15 <222> (163)..(167)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> VARIANTE
20 <222> (170)..(174)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> VARIANTE
25 <222> (177)..(181)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> VARIANTE
30 <222> (184)..(188)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> VARIANTE
35 <222> (191)..(195)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> VARIANTE
40 <222> (198)..(202)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> VARIANTE
45 <222> (205)..(209)
<223> /sustituir=" "

<220>
<221> MISC_FEATURE
50 <222> (1)..(210)
<223> /nota="Los residuos variantes proporcionados en la secuencia no tienen
preferencia con respecto a los de las anotaciones para las posiciones
variantes"

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(210)
<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar de 1 a 30 unidades de repetición
60 'Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser' en la que algunas posiciones pueden estar
ausentes"

<220>
<221> fuente
65 <223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción
detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

<400> 119

```

ES 2 919 749 T3

1 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 5 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 10 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 15 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 20 Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 25 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
 30 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 35 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 40 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 45 Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 50 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly

55 Gly Ser  
 210

60 <210> 120  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>  
 <221> VARIANTE

<222> (2)..(6)  
<223> /sustituir=" "

5 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (9)..(13)  
<223> /sustituir=" "

10 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (16)..(20)  
<223> /sustituir=" "

15 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (23)..(27)  
<223> /sustituir=" "

20 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (30)..(34)  
<223> /sustituir=" "

25 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (37)..(41)  
<223> /sustituir=" "

30 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (44)..(48)  
<223> /sustituir=" "

35 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (51)..(55)  
<223> /sustituir=" "

40 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (58)..(62)  
<223> /sustituir=" "

45 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (65)..(69)  
<223> /sustituir=" "

50 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (72)..(76)  
<223> /sustituir=" "

55 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (79)..(83)  
<223> /sustituir=" "

60 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (86)..(90)  
<223> /sustituir=" "

65 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (93)..(97)  
<223> /sustituir=" "

5  
5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (100)..(104)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (107)..(111)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (114)..(118)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (121)..(125)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (128)..(132)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (135)..(139)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (142)..(146)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (149)..(153)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (156)..(160)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (163)..(167)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (170)..(174)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (177)..(181)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (184)..(188)  
<223> /sustituir=" "

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (191)..(195)

```

5  <223> /sustituir=" "
    <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (198)..(202)
    <223> /sustituir=" "

10 <220>
    <221> VARIANTE
    <222> (205)..(209)
    <223> /sustituir=" "

15 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (1)..(210)
    <223> /nota=" Los residuos variantes proporcionados en la secuencia no tienen
    preferencia con respecto a los de las anotaciones para las posiciones
    variantes"

20 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (1)..(210)
    <223> /nota="Esta secuencia puede abarcar de 1 a 30 unidades de repetición
    'Ser Ser Ser Ser Ser Gly' en la que algunas posiciones pueden estar
25 ausentes"

    <220>
    <221> fuente
    <223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción
30 detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

    <400> 120
    Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
35 1 5 10 15
    Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
    20 25 30
40 Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
    35 40 45
45 Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser
    50 55 60
    Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser
50 65 70 75 80
    Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser
55 85 90 95
    Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly
    100 105 110
60 Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
    115 120 125
65 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser
    130 135 140

```

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
 145 150 155 160

5 Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser  
 165 170 175

10 Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser  
 180 185 190

15 Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser  
 195 200 205

Ser Gly  
 210

20 <210> 121  
 <211> 150  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (6)..(150)  
 <223> /sustituir=" "

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(150)  
 <223> /nota=" Los residuos variantes proporcionados en la secuencia no tienen  
 40 preferencia con respecto a los de las anotaciones para las posiciones  
 variantes"

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(150)  
 <223> /nota="Esta secuencia puede abarcar de 1 a 30 unidades de repetición  
 'Gly Gly Gly Gly Ser' en la que algunas posiciones pueden estar ausentes"

50 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción  
 detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

55 <400> 121  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 1 5 10 15

60 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 20 25 30

65 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 50 55 60

5 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly 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

10 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
100 105 110

15 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

20 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
130 135 140

25 Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
145 150

30 <210> 122  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Secuencia Artificial

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

35 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (2)..(30)  
<223> /sustituir=" "

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(30)  
<223> /nota=" Los residuos variantes proporcionados en la secuencia no tienen  
45 preferencia con respecto a los de las anotaciones para las posiciones  
variantes"

50 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(30)  
<223> /nota="Esta secuencia puede abarcar de 1 a 30 residuos, en la que  
algunas posiciones pueden estar ausentes"

55 <220>  
<221> fuente  
<223> /nota="Véase la memoria tal como se presentó para una descripción  
detallada de sustituciones y realizaciones preferidas"

60 <400> 122  
Gly  
1 5 10 15

65 Gly  
20 25 30

<210> 123  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 5  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
 10  
 <400> 123  
 Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Ser  
 1 5 10  
 15  
 <210> 124  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
 25  
 <400> 124  
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Lys Gly  
 1 5 10  
 30  
 <210> 125  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 35  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
 40  
 <400> 125  
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Ser Ser Glu Gly Ser Gly Ser Thr  
 1 5 10 15  
 45  
 Lys Gly  
 50  
 <210> 126  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
 60  
 <400> 126  
 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr  
 1 5 10 15  
 65  
 Lys Gly  
 <210> 127

- <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
- 10 <400> 127  
 Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Glu Phe  
 1 5 10
- 15 <210> 128  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
- 25 <400> 128  
 Ser Arg Ser Ser Gly  
 1 5
- 30 <210> 129  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
- 40 <400> 129  
 Ser Gly Ser Ser Cys  
 1 5
- 45 <210> 130  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 50 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"
- 55 <400> 130  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15
- 60 <210> 131  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial
- 65 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

5 <400> 131  
 Gly Gly Gly Ser  
 1

10 <210> 132  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

20 <400> 132  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

25 <210> 133  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

35 <400> 133  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 1 5

40 <210> 134  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

50 <400> 134  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5

55 <210> 135  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

65 <400> 135  
 Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Ser

5 <210> 136  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <221> fuente  
 10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
  
 <400> 136  
 15 Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Ser Glu Gly Ser Thr  
 1 5 10 15  
  
 Lys Gly  
 20  
  
 <210> 137  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 25 <213> Plasmodium falciparum  
  
 <400> 137  
 Thr Leu Asp Glu Met Arg His Phe Tyr  
 1 5  
 30

## REIVINDICACIONES

1. Molécula dirigida a células citotóxica, que comprende:  
 5 i) una región de unión heteróloga capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular,  
 ii) un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende
- (a) una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y  
 (b) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1, y
- 10 iii) un resto molecular que tiene una masa de al menos 1,5 kDa y está asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga;  
 en la que la molécula dirigida a células citotóxica no comprende un sitio de escisión por furina compensatorio;  
 y en la que la molécula dirigida a células citotóxica es capaz de exhibir  
 una estabilidad mejorada y/o  
 15 una tolerabilidad *in vivo* mejorada  
 en comparación con una segunda molécula dirigida a células que consiste en la molécula dirigida a células citotóxica, excepto por el polipéptido efector de la toxina Shiga que consiste en un polipéptido A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje.
- 20 2. Molécula dirigida a células citotóxica, según la reivindicación 1,  
 en la que el resto molecular tiene una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, o 50 kDa;  
 en la que el resto molecular comprende la región de unión;  
 y/o  
 25 en la que el resto molecular comprende al menos un residuo de aminoácido y el polipéptido efector de la toxina Shiga está fusionado con al menos un residuo de aminoácido del resto molecular.
3. Molécula dirigida a células citotóxica, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el resto molecular es citotóxico.
- 30 4. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es capaz de exhibir una citotoxicidad equivalente a la citotoxicidad de la segunda molécula dirigida a células.
5. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la molécula dirigida a células es capaz de exhibir una tolerabilidad *in vivo* mejorada en comparación con la segunda molécula dirigida a células.
- 35 6. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación relativa con respecto a una subunidad A natural de un miembro de la familia de toxina Shiga que reduce la actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga, y en la que el polipéptido efector de la toxina Shiga exhibe al menos una función efectora de la toxina Shiga seleccionada entre:  
 suministrar un material exógeno a una célula, dirigir el enrutamiento intracelular y citotoxicidad.
- 40 7. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones con respecto a una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, alterando la mutación al menos un residuo de aminoácido en la región localizada originalmente en 248-251 de la subunidad A de toxina semejante a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) o en 247-250 de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 2 (SEQ ID NO: 3);  
 y/o en la que el motivo de escisión por furina alterado comprende una sustitución de residuo de aminoácido con respecto a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, de al menos un residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina y/o opcionalmente en un sitio mínimo de escisión por furina; opcionalmente en la que al menos una de las sustituciones es de un residuo de arginina por un residuo de aminoácido cargado no positivamente, opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en: alanina, glicina, prolina, serina, treonina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, triptófano y tirosina.
- 45 8. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la región de unión comprende un polipéptido que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina; opcionalmente en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina 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,  
 60 fragmento de una región determinante de complementariedad 3, polipéptido FR3-CDR3-FR4 restringido, fragmento Fd, fragmento de unión a antígeno, 10º 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, andamio estructural de dominio del tipo lectina de tipo C; y/o  
 65 en la que la región de unión es capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que

consiste en:

5 CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, endoglina/CD105, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, CD133, gpA33, mucina, TAG-72, 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, RANKL, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa humana 1, proteína relacionada con la tirosinasa humana 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, FcεR1a, galectina-9, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, FcεR1a, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, CD11a-c, GITRL, 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.

20 9. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que tras la administración de la molécula dirigida a células citotóxica a una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente a dicha biomolécula diana extracelular y a una segunda población de células cuyos miembros no están acoplados físicamente a dicha biomolécula diana extracelular, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a células citotóxica 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, opcionalmente, en la que dicha primera población de células está acoplada físicamente con dicha biomolécula diana extracelular por medio de interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan la biomolécula diana extracelular, o una parte de la misma, al exterior de una célula; o en la que dicha biomolécula diana extracelular es una proteína integral de membrana o proteína de membrana periférica acoplada a la membrana celular de la célula o la primera población de células.

30 10. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende o consiste en la secuencia de polipéptidos que se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 4-49, opcionalmente en la que la molécula dirigida a células citotóxica comprende o consiste en la secuencia de polipéptido mostrada en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 50-61.

35 11. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL.

40 12. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además un material exógeno adicional seleccionado de uno cualquiera de: péptido, proteína, agente citotóxico, agente promotor de la detección, agente quimioterapéutico de molécula pequeña y polinucleótido, en la que, después de la administración de la molécula dirigida a células citotóxica a una célula que expresa la biomolécula diana extracelular sobre una superficie celular, la molécula dirigida a células citotóxica es capaz de suministrar el material exógeno adicional en la célula, opcionalmente en la que el material exógeno adicional es un péptido o proteína que comprende un antígeno.

45 13. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en forma de un homomultímero o un heteromultímero, y/o en forma de un solvato o sal farmacéuticamente aceptable.

50 14. Polinucleótido que codifica una molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o un complemento del mismo.

55 15. Composición farmacéutica que comprende una molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, y al menos un excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptable;

opcionalmente en la que la composición comprende:

(i) un disolvente, tal como agua, alcohol (por ejemplo etanol), poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol o polietilenglicol), ácido acético o ácido láctico;

(ii) un diluyente, tal como agua, solución salina o poliol (por ejemplo, polietilenglicol, glicerina o propilenglicol);

(iii) un medio de dispersión, tal como agua, alcohol (por ejemplo etanol), o poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol o polietilenglicol);

(iv) un recubrimiento, tal como lecitina;

(v) un agente isotónico, tal como azúcar, polialcohol (por ejemplo, manitol), sorbitol, cloruro de sodio o inyección de Ringer;

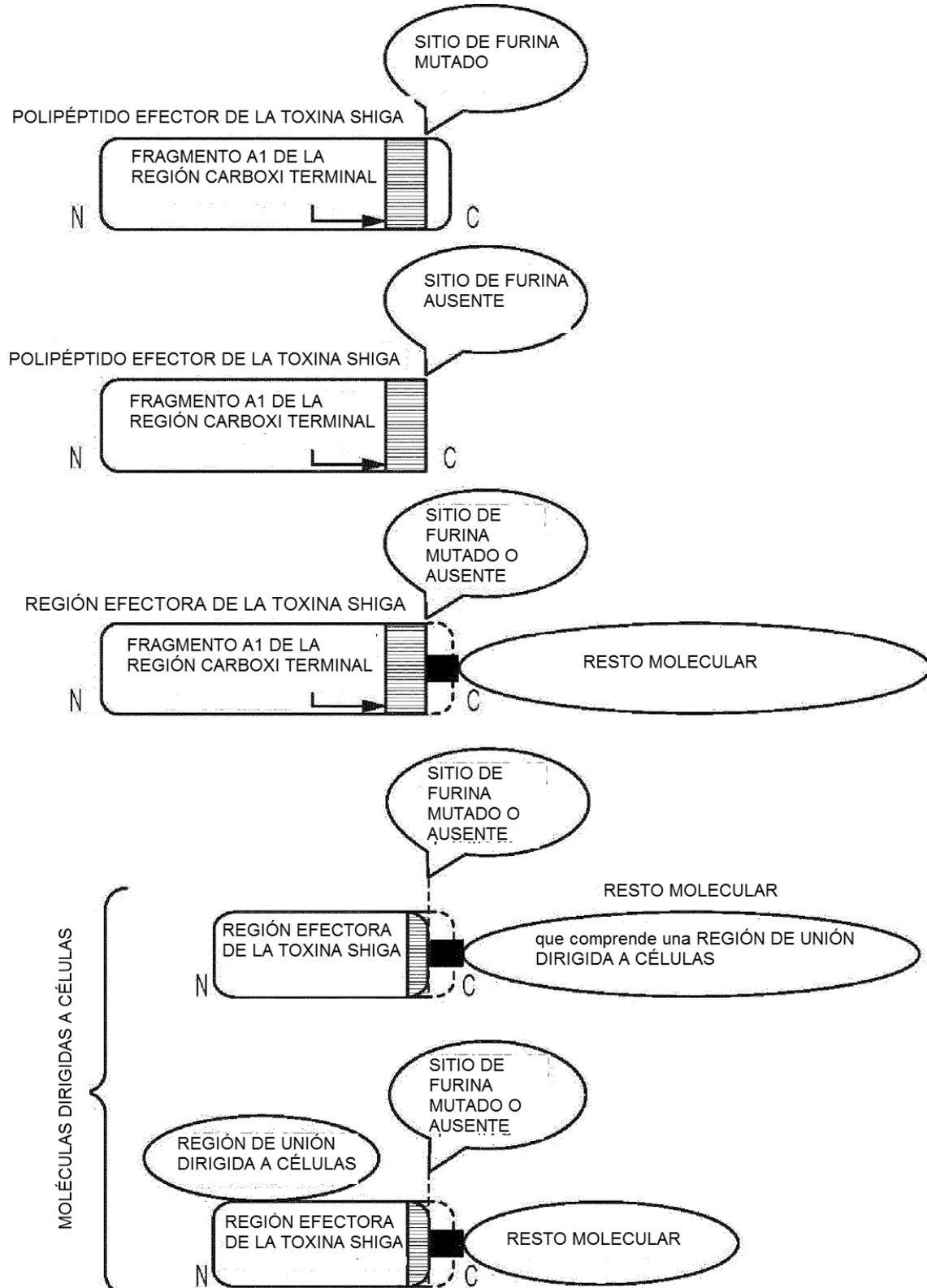
(vi) un agente retardante de la adsorción, tal como una sal de monoestearato (por ejemplo, monoestearato de aluminio) o gelatina;

(vii) un portador acuoso o un portador no acuoso, tal como agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol o

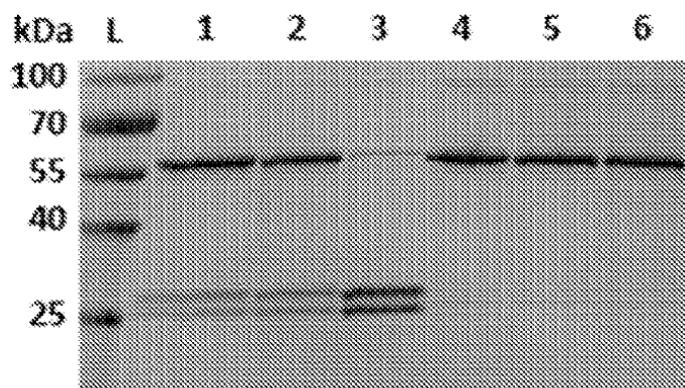
- polietilenglicol), aceite vegetal o éster orgánico (por ejemplo, oleato de etilo);  
 (viii) un tampón, tal como un tampón de acetato, un tampón de citrato o un tampón de fosfato;  
 (ix) un agente de ajuste de la tonicidad, tal como cloruro de sodio o dextrosa;  
 5 (x) un adyuvante, tal como un conservante, un agente humectante, un agente emulsionante o un agente dispersante;  
 (xi) un agente antibacteriano o un agente antifúngico, tal como alcohol bencílico, parabenos (por ejemplo, metil parabeno), clorobutanol, fenol o ácido sórbico;  
 (xii) un tensioactivo;  
 10 (xiii) un antioxidante, tal como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, galato de propilo o alfa-tocoferol;  
 (xiv) un agente quelante, tal como ácido cítrico, sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico o ácido etilendiaminotetraacético; o  
 15 (xv) un estabilizador.
16. Composición de diagnóstico, que comprende:  
 un molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13; y  
 un agente promotor de la detección.
- 20 17. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, una composición farmacéutica, según la reivindicación 15, o una composición de diagnóstico, según la reivindicación 16, que se inmoviliza sobre un sustrato sólido.
- 25 18. Kit que comprende:  
 un molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13;  
 un polinucleótido, según la reivindicación 14;  
 una composición farmacéutica, según la reivindicación 15;  
 una composición de diagnóstico, según la reivindicación 16; o  
 30 un molécula dirigida a células citotóxica, composición farmacéutica o composición de diagnóstico, según la reivindicación 17;  
 y un reactivo o dispositivo de liberación farmacéutica adicionales.
- 35 19. Procedimiento *in vitro* para eliminar una célula, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 15.
- 40 20. Procedimiento *in vitro* para suministrar un material exógeno en una célula que expresa que expresa la biomolécula diana extracelular sobre una superficie celular, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una molécula dirigida a células citotóxica, según la reivindicación 12.
- 45 21. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 15, para usar como un medicamento.
- 50 22. Molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 15, para usar en el tratamiento o la prevención del cáncer, un tumor, un trastorno inmunitario o una infección microbiana;  
 opcionalmente en la que el cáncer se selecciona de entre el 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 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, 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.
- 55 23. Uso de una molécula dirigida a células citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, composición farmacéutica, según la reivindicación 15, o composición de diagnóstico, según la reivindicación 16, en el diagnóstico, pronóstico o caracterización *in vitro* de una enfermedad, trastorno o afección.
- 60 24. Procedimiento para mejorar la estabilidad *in vitro* y/o tolerabilidad *in vivo* de una molécula dirigida a células citotóxica, que comprende:  
 i) un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende
- 65 (a) una región del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y  
 (b) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1, y

- ii) un resto molecular que tiene una masa de al menos 1,5 kDa y está asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, y que comprende una región de unión heteróloga capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular;
- 5 comprendiendo el procedimiento la etapa de alterar el motivo de escisión por furina que comprende el sitio de escisión por furina en la molécula dirigida a células citotóxica, en el que el procedimiento no comprende una etapa de introducir un sitio de escisión por furina compensatorio.
- 10 25. Procedimiento, según la reivindicación 24, en el que el resto molecular tiene una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa o 50 kDa.

**Figura 1. Dibujo esquemático de la arquitectura general de polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga de ejemplo y moléculas dirigidas a células de la presente invención**



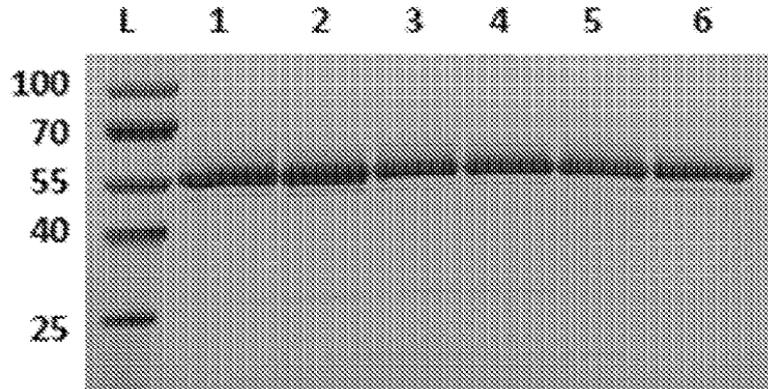
**Figura 2. La molécula dirigida a célula SLT-1A-FR::scFv-1 de ejemplo mostró resistencia a la proteólisis por furina en comparación con SLT-1A-WT::scFv-1**



L = escalera de peso molecular

1. SLT-1A-WT::scFv1: 4°C, 25 horas, sin furina
2. SLT-1A-WT::scFv1: 30°C, 25 horas, sin furina
3. SLT-1A-WT::scFv1: 30°C, 25 horas, 0,5 U/ug furina
4. SLT-1A-FR::scFv1: 4°C, 25 horas, sin furina
5. SLT-1A-FR::scFv1: 30°C, 25 horas, sin furina
6. SLT-1A-FR::scFv1: 30°C, 25 horas, 0,5 U/ug furina

**Figura 3. La molécula dirigida a células SLT-1A-FR::scFv-2 mostró resistencia a la proteólisis por furina a varias temperaturas**



**L =** escalera de pesos moleculares

1. SLT-1A-FR::scFv2: 4°C, 30 horas, sin furina
2. SLT-1A-FR::scFv2: 4°C, 30 horas, 0,5 U/ug furina
3. SLT-1A-FR::scFv2: 30°C, 30 horas, sin furina
4. SLT-1A-FR::scFv2: 30°C, 30 horas, 0,5 U/ug furina
5. SLT-1A-FR::scFv2: 37°C, 30 horas, sin furina
6. SLT-1A-FR::scFv2: 37°C, 30 horas, 0,5 U/ug furina

Figura 4. Citotoxicidad específica de SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-WT::scFv-1 a células positivas diana

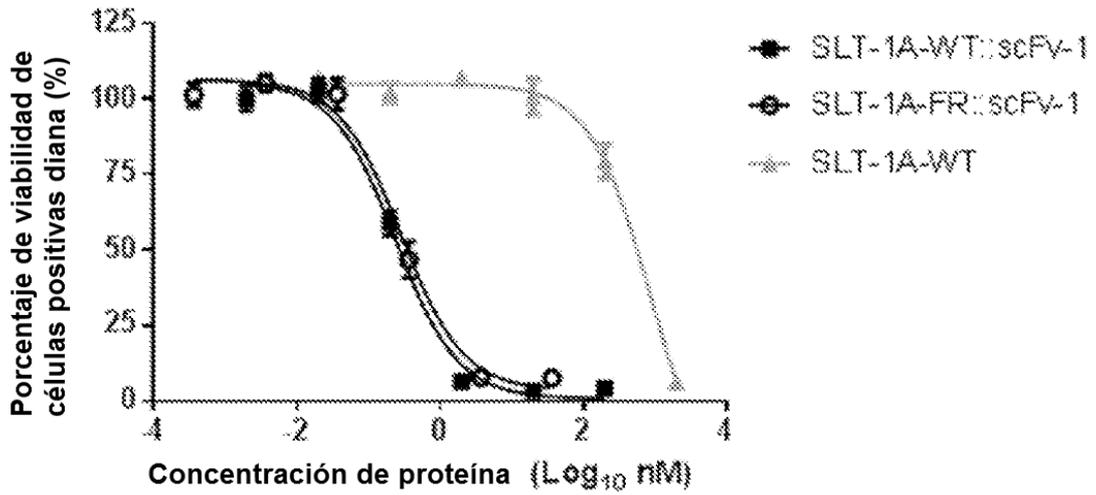
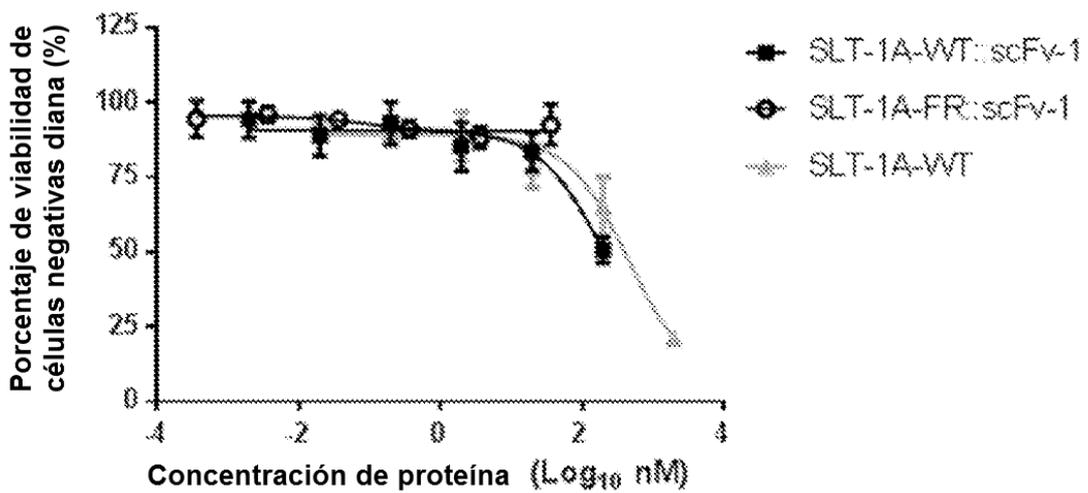
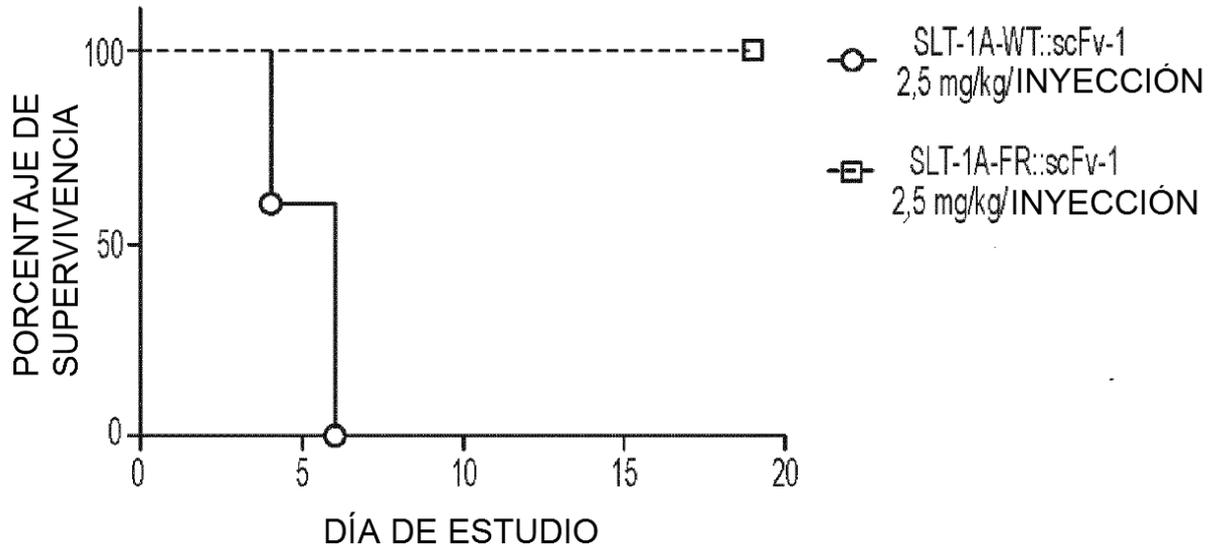


Figura 5. Falta de citotoxicidad específica de SLT-1A-FR::scFv-1 y SLT-1A-WT::scFv-1 a células negativas diana



**Figura 6. Mejora de la tolerabilidad in vivo de SLT-A1-FR::scFv-1 en comparación con SLT-A1-WT::scFv-1.** La SLT-A1-FR::scFv-1 resistente a la escisión por proteasa se toeró mejor que la SLT-A1-WT::scFv-1 sensible a la escisión por proteasa a dosis de 2,5 mg por kg por inyección para tres inyecciones



**Figura 7. SLT-A1-FR::scFv-2 inhibió el crecimiento de células tumorales humanas in vivo en un modelo de xenoinjerto murino para cáncer humano**

