

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 643**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01) **C12N 15/13** (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2005 E 05728983 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1737961**

54 Título: **Proteínas bouganina modificadas, citotoxinas y procedimientos y usos de las mismas**

30 Prioridad:

19.03.2004 US 554580 P

26.11.2004 US 630571 P

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

07.10.2013

73 Titular/es:

**MERCK PATENT GMBH (100.0%)
POSTFACH, FRANKFURTER STRASSE 250
64271 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**BAKER, MATTHEW;
CARR, FRANCIS J.;
HELLENDORRN, KOEN;
CIZEAU, JEANNICK;
MACDONALD, GLEN CHRISTOPHER;
ENTWISTLE, JOYCELYN;
BOSC, DENIS GEORGES y
GLOVER, NICHOLAS RONALD**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 424 643 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas bouganina modificadas, citotoxinas y procedimientos y usos de las mismas

Campo de la invención

5 La invención se refiere a proteínas bouganina modificadas y a citotoxinas que contienen las proteínas modificadas útiles como agentes terapéuticos contra el cáncer. Específicamente, los epítomos de linfocitos T se retiran o modifican para reducir la inmunogenicidad de las toxinas bouganina.

Antecedentes de la invención

10 Existen muchos casos en los que la eficacia de una proteína terapéutica está limitada por una reacción inmunitaria no deseada contra la proteína terapéutica. Se ha demostrado que diversos anticuerpos monoclonales de ratón son terapias prometedoras en diversos entornos de enfermedades humanas pero en algunos casos han fallado debido a la inducción de grados significativos de una respuesta de anticuerpos antimurinos (HAMA) [Schroff, R. W. y col (1985) Cancer Res. 45: 879-885; Shawler, D. L. y col (1985) J. Immunol. 135: 1530-1535]. Para anticuerpos monoclonales, se han desarrollado diversas técnicas en intentos de reducir la respuesta HAMA [documentos WO 89/09622; EP 0239400; EP 0438310; WO 91/06667]. Estas estrategias de ADN recombinante han reducido
15 generalmente la información genética de ratón en la construcción de anticuerpo final mientras que aumenta la información genética humana en la construcción final. No obstante, los anticuerpos "humanizados" resultantes han inducido aún, en algunos casos, una respuesta inmunitaria en pacientes [Issacs J. D. (1990) Sem. Immunol. 2: 449, 456; Rebello, P. R. y col (1999) Transplantation 68: 1417-1420].

20 La clave para la inducción de una respuesta inmunitaria es presencia dentro de la proteína de péptidos que pueden estimular la actividad de linfocitos T mediante la presentación de moléculas del MHC de clase II, denominadas "epítomos de linfocitos T". Dichos epítomos de linfocitos T se definen normalmente como cualquier secuencia de restos de aminoácidos con la capacidad de unirse a moléculas del MHC de Clase II. Implícitamente, un "epítomo de linfocito T" significa un epítomo que cuando está unido a moléculas del MHC puede reconocerse por un receptor de linfocitos T (TCR), y que puede, al menos en principio, causar la activación de estos linfocitos T acoplándose a un TCR para
25 promover una respuesta de linfocitos T.

30 Las moléculas del MHC de Clase II son un grupo de proteínas muy polimórficas que desempeñan una función principal en la selección y activación de linfocitos T auxiliares. El grupo antigénico leucocitario humano DR (HLA-DR) es el isotipo predominante de este grupo de proteínas; sin embargo, los isotipos HLA-DQ y HLA-DP realizan funciones similares. En a la población humana, los individuos portan de dos a cuatro alelos DR, dos alelos DQ y dos
35 alelos DP. La estructura de diversas moléculas DR se ha resuelto y estas aparecen como un péptido de extremos abiertos que se une al surco con diversos bolsillos hidrófobos que acoplan restos hidrófobos (restos de bolsillo) del péptido [Brown y col (1993) Nature 364: 33; Stern y col (1994) Nature 368: 215]. El polimorfismo que identifica los diferentes alotipos de las moléculas de clase II contribuye a una amplia diversidad de diferentes superficies de unión para péptidos dentro del surco de unión a péptidos y el nivel de población garantiza la máxima flexibilidad con
respecto a la capacidad para reconocer proteínas extrañas y provocar una respuesta inmunitaria frente a organismos patógenos.

40 Una respuesta inmunitaria contra una proteína terapéutica se realiza mediante la ruta de presentación del péptido del MHC de clase II. En este caso, proteínas exógenas se absorben y procesan para la presentación en asociación con las moléculas del MHC de clase II de tipo DR, DQ o DP. Las moléculas del MHC de Clase II se expresan por células presentadoras de antígeno (APC) profesionales, tales como macrófagos y células dendríticas entre otras. El acoplamiento de un complejo peptídico MHC de clase II por un receptor de linfocito T afín sobre la superficie del linfocito T, junto con la unión cruzada de determinados otros correceptores tales como la molécula CD4, puede inducir un estado activado dentro del linfocito T. La activación conduce a la liberación de citocinas activando adicionalmente
45 otros linfocitos tales como linfocitos B para producir anticuerpos o linfocitos citolíticos T activadores como una respuesta inmunitaria celular completa.

50 La identificación del epítomo de linfocitos T es la primera etapa para la eliminación epitópica como se reconoce en los documentos WO98/52976; WO00/34317; WO02/069232; WO02/079232; y WO02/079415. En estas enseñanzas, se retiran epítomos de linfocitos T predichos por el uso de sustitución de aminoácidos sensata dentro de la proteína de interés. Junto con técnicas informáticas, existen procedimientos *in vitro* para medir la capacidad de péptidos sintéticos de unirse a moléculas del MHC de clase II. Un procedimiento ejemplar utiliza líneas de linfocitos B de alotipo MHC definido como una fuente de superficie de unión de MHC de clase II y puede aplicarse a identificación de ligandos de MHC de clase II [Marshall K. W. y col. (1994) J. Immunol. 152: 4946-4956; O'Sullivan y col (1990) J. Immunol. 145: 1799-1808; Robadey C. y col (1997) J. Immunol 159: 3238-3246]. Sin embargo, dichas técnicas no están adaptadas para la exploración de múltiples epítomos posibles con respecto a una amplia diversidad de alotipos de
55 MHC, ni pueden confirmar la capacidad de un péptido de unión para actuar como un epítomo de linfocitos T.

Las técnicas para aprovechar complejos solubles de moléculas MHC recombinantes en combinación con péptidos sintéticos también han comenzado a usarse [Kern, F. y col (1998) Nature Medicine 4: 975-978; Kwok, W. W. y col (2001) TRENDS in Immunol. 22: 583-588]. Estos reactivos y procedimientos se usan para identificar la presencia de clones

de linfocitos T a partir de muestras de sangre periférica de sujetos humanos o en animales experimentales que pueden unir complejos peptídicos MHC particulares y no están adaptados para la exploración de múltiples epítomos posibles con respecto a una amplia diversidad de alotipos de MHC.

- 5 Los ensayos biológicos de activación de linfocitos T ofrecen una opción práctica para proporcionar una lectura de la capacidad de una secuencia peptídica/proteica de ensayo para suscitar una respuesta inmunitaria. Como ejemplos de este tipo de estrategias se incluyen el trabajo de Petra y col. usando ensayos de proliferación de linfocitos T con respecto a la proteína bacteriana estafiloquinasa, seguido de mapeo epitópico usando péptidos sintéticos para estimular líneas de linfocitos T [Petra, A. M. y col (2002) J. Immunol. 168: 155-161]. De manera similar, ensayos de proliferación de linfocitos T utilizando péptidos sintéticos de la proteína de la toxina del tétano han dado como resultado la definición de regiones epitópicas inmunodominantes de la toxina [Reece J. C. y col (1993) J. Immunol. 151: 6175-6184]. El documento WO99/53038 desvela una estrategia mediante la cual epítomos de linfocitos T en una proteína de ensayo puede determinarse usando subconjuntos aislados de células inmunitarias humanas, promoviendo su diferenciación *in vitro* y cultivo de las células en presencia de péptidos sintéticos de interés y mediciones de cualquier proliferación inducida en los linfocitos T cultivados. La misma técnica también la describen Stickler y col. [Stickler, M. M. y col (2000) J. Immunotherapy 23: 654-660], en la que en ambos casos el procedimiento se aplica a la detección de epítomos de linfocitos T dentro de la subtilisina bacteriana. Dicha técnica requiere aplicación cuidadosa de técnicas de aislamiento celular y de cultivo celular con complementos de citocinas múltiples para obtener los subconjuntos celulares inmunitarios deseados (células dendríticas, linfocitos T CD4+ y o CD8+) y no conduce a una rápida selección de alto rendimiento usando muestras de donantes múltiples.
- 10
- 15
- 20 Recientemente también se ha avanzado una estrategia de combinación que usa ensayos de proliferación de linfocitos T basados en población y en simulación por ordenador de la unión de MHC peptídica en el diseño de proteínas empobrecidas para epítomo [documento WO 03/104803].

Como se ha expuesto anteriormente y como una consecuencia de los mismos, sería deseable identificar y retirar o al menos reducir epítomos de células de linfocitos T de un péptido, polipéptido o proteína principal terapéuticamente valioso pero originalmente inmunogénico.

25

Sumario de la invención

La invención se diseña para superar la realidad práctica de que las proteínas solubles introducidas con intención terapéutica en seres humanos pueden desencadenar una respuesta inmunitaria dando como resultado el desarrollo de anticuerpos huésped que se unen a la proteína soluble. La presente invención intenta abordar esto proporcionando proteínas bouganina con una propensión reducida para suscitar una respuesta inmunitaria. De acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento, los autores de la invención han identificado las regiones de la molécula bouganina que comprende los epítomos de linfocitos T críticos que conducen las respuestas inmunitarias a esta proteína.

30

La presente invención se refiere a una proteína bouganina modificada en la que la bouganina modificada tiene una propensión reducida para suscitar una respuesta inmunitaria en la que dicha bouganina tiene una sustitución de aminoácidos de uno o más de X¹, X², X³, X⁴ o X⁵ en un epítomo de linfocito T seleccionado del grupo que consiste en:

35

- a) AKX¹DRKX²LX³LGVX⁴KL (región epitópica R1, SEC ID N°: 8)
- b) LGVX⁴KLEFSJEAHIG (región epitópica R2, SEC ID N°: 9); y
- c) NGQEX⁵AKFFLVIQIM (región epitópica R3, SEC ID N°: 10) en la que:

- 40
- X¹ es T o A o Q;
 - X² es G o A;
 - X³ es Q o G;
 - X⁴ es N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S; y
 - X⁵ es Q o A.

45 En una realización preferida, la bouganina modificada tiene una propensión reducida para activar linfocitos T y la bouganina modificada está modificada en uno o más restos de aminoácidos en un epítomo de linfocito T. Los epítomos de linfocitos T en los que se introducen las sustituciones de aminoácidos se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en:

- 50
- a) AKVDRKDLELGVYKL (región epitópica R1, SEC ID N°: 2),
 - b) LGVYKLEFSJEAHIG (región epitópica R2, SEC ID N°: 3); y
 - c) NGOEIAKFFLVIQIM (región epitópica R3, SEC ID N°: 4).

La presente invención también proporciona una citotoxina que comprende un resto diana unido a una proteína bouganina modificada de la invención. En una realización, el resto diana es un ligando que se une a una célula cancerosa. En una realización adicional, el ligando es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a una célula cancerosa. En una realización particular, el anticuerpo reconoce Ep-CAM o un antígeno asociado a tumor. En una realización más particular, la presente invención proporciona una citotoxina que comprende VB6-845 o VB6-01

55

1.

En otro aspecto, la invención proporciona un uso de una citotoxina de la invención en la fabricación de un medicamento para inhibir o destruir células cancerosas. En otras palabras, la invención proporciona una citotoxina de la invención para su uso en la inhibición o destrucción de células cancerosas.

5 La presente invención también se refiere a un uso de una citotoxina de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer. En otras palabras, la invención proporciona una citotoxina de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer.

10 Adicionalmente, se proporciona un proceso para preparar una composición farmacéutica para tratar a un animal con cáncer que comprende las etapas de identificar epítomos de linfocitos T de la bouganina, modificar uno o más restos de aminoácidos en un epítomo de linfocito T para preparar una bouganina modificada de acuerdo con la presente invención que tiene una propensión reducida para activar linfocitos T; preparar una citotoxina que tenga un ligando de unión a cáncer unido a una bouganina modificada, y suspender la citotoxina en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de un animal con cáncer que comprende la citotoxina de la invención y un vehículo diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las citotoxinas, composiciones y usos de la presente invención pueden usarse para tratar diversas formas de cáncer tal como cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer microcítico y no microcítico pulmonar, sarcomas, gliomas, linfomas de linfocitos T y B.

20 La invención también proporciona péptidos epitópicos de linfocitos T modificados de la invención como se define por las reivindicaciones 25 a 27.

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos aunque indiquen realizaciones preferidas de la invención se proporcionan únicamente a modo de ilustración.

25 **Breve descripción de los dibujos**

La invención se describirá ahora en relación a los dibujos en los que:

30 La **Figura 1** muestra resultados de ensayos de actividad de las proteínas bouganina modificadas empobrecidas de epítomo de linfocitos T Bou156 (panel A) y Bou157 (panel B). Bou156 comprende las sustituciones V123A, D127A, Y133N e I152A. Bou157 comprende las sustituciones V123A, D127A, Y133Q e I152A. Ambos conjuntos de ensayo se realizaron usando la proteína de tipo silvestre y una bouganina modificada inactivada (Y70A) como controles. La actividad se expresó como % de actividad luciferasa medida frente a la concentración de la proteína bouganina en el ensayo.

35 La **Figura 2** muestra los resultados de ensayo de proliferación de linfocitos T para tres péptidos sintéticos y 2 muestras donantes de PBMC diferentes. Los péptidos denominados Del-41, Del-44 y Del-50 se sometieron a ensayo a una concentración final de 1 μ M (panel A) y una concentración final de 5 μ M (panel B). Estos péptidos derivan de las regiones inmunogénicas de la molécula de bouganina y contienen sustituciones diseñadas para eliminar su inmunogenicidad.

40 La **Figura 3** ilustra VB6-845, una citotoxina bouganina modificada que tiene un Fab anti-Ep-CAM, en el que la de-bouganina (Bou156) está unida al extremo C del dominio CH mediante un engarce de furina. La Figura 3A ilustra la unidad dicistrónica que codifica las secuencias pro, la Figura 3B ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 15) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 16) de las secuencias pro y la Figura 3C ilustra la proteína VB6-845 ensamblada sin las secuencias peIB.

45 La **Figura 4** ilustra el mapa del vector de expresión pING3302. Los insertos de los ejemplos se ligaron en el vector 3302 usando los sitios de restricción EcoRI y XhoI.

La **Figura 5** ilustra la construcción de control Fab anti-Ep-CAM, sin la toxina vegetal, de-bouganina (VB5-845). La Figura 5A ilustra la unidad dicistrónica que codifica las secuencias pro, la Figura 5B ilustra la secuencia que codifica el ácido nucleico (SEC ID N°: 17) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 18) de las secuencias pro y la Figura 5C ilustra la proteína VB5-845 ensamblada sin las secuencias peIB.

50 La **Figura 6** ilustra la construcción de-bouganina Fab anti-Ep-CAM VB6-845-C_L-de-bouganina, en el que el Bou156 está unido en el extremo C del dominio C_L. La Figura 6A ilustra las unidades dicistrónicas que codifican las secuencias pro, la Figura 6B ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 19) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 20) de las secuencias pro y la Figura 6C ilustra la proteína VB6-845-C_L-de-bouganina ensamblada sin las secuencias peIB.

55 La **Figura 7** ilustra la construcción Fab anti Ep-CAM, de-bouganina, VB6-845-NV_H-de-bouganina, en la que Bou156 está unido al extremo N del dominio V_H. La Figura 7A ilustra las unidades dicistrónicas que codifican las secuencias pro, la Figura 7B ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 21) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 22) de las secuencias pro y la Figura 7C ilustra la proteína VB6-845-NV_H-de-bouganina ensamblada sin las secuencias peIB.

La **Figura 8** ilustra la construcción Fab anti Ep-CAM, de-bouganina, VB6-845-NV_L-de-bouganina, en la que Bou156 está unido al extremo N del dominio V_L. La Figura 8A ilustra las unidades dicistrónicas que codifican las secuencias pro, la Figura 8B ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 23) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 24) de las secuencias pro y la Figura 8C ilustra la proteína VB6-845-NV_L-de-bouganina ensamblada sin las secuencias pelB.

La **Figura 9** es una Transferencia de Western que ilustra la expresión de VB6-845 (construcción de la Figura 3) y VB6-845-CL-de-bouganina (Bou156) (construcción de la Figura 6) en el sobrenadante de células E104 inducidas a escala de laboratorio.

La **Figura 10** ilustra los resultados de los estudios de reactividad de citometría de flujo. La Figura 10A ilustra la reactividad de VB6-845 (construcción de la Figura 3) y VB6-845-CL-de-bouganina (construcción de la Figura 6) en líneas celulares Ep-CAM-positivas CAL 27 y OVCAR-3 y la línea celular Ep-CAM-negativa A-375, mientras que la Figura 10B, ilustra los resultados de los mismos ensayos realizados con VB6-845 (construcción de la Figura 3) y VB6-845-gelonina (construcción de la Figura 14C) y control (PBS).

La **Figura 11** es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo de competencia-V6-845 y Proxinium™ en células NIH:OVCAR-3 y como se describe en el Ejemplo 7.

La **Figura 12** es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo acelular del Ejemplo 7.

La **Figura 13** ilustra los resultados del ensayo de citotoxicidad MTS del Ejemplo 8 comparando la citotoxicidad de VB6-845 (construcción de la Figura 3), VB6-845-CL-de-bouganina (construcción de la Figura 6) y de-bouganina (Bou156) en células CAL 27 (Figura 13A) y NIH:OVCAR3 (Figura 13B).

Las **Figuras 14A y B** ilustran los resultados del ensayo de citotoxicidad MTS del Ejemplo 8 que compara la citotoxicidad de VB6-845 (construcción de la Figura 3), VB6-845-gelonina (construcción de la Figura 14C) y gelonina en células CAL 27 (Figura 14A) y NIH:OVCAR3 (Figura 14B). La **Figura 14C** ilustra la secuencia que codifica el ácido nucleico (SEC ID N°: 25) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 26) de la construcción VB6-845-gelonina.

La **Figura 15** ilustra la secuencia que codifica el ácido nucleico (SEC ID N°: 27) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 28) de las secuencias pro de VB6-011.

La **Figura 16** ilustra los resultados del ensayo de citotoxicidad MTS del Ejemplo 9 que muestra la citotoxicidad de VB6-011 en células MB-435S.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la invención han identificado epítomos de linfocitos T en bouganina, y han diseñado y realizado proteínas bouganina modificadas que tienen una propensión reducida para activar linfocitos T humanos en comparación con la proteína bouganina no modificada.

(A) Proteínas bouganina modificadas

La presente invención se refiere a una proteína bouganina modificada en la que la bouganina se ha modificado para tener una propensión reducida a suscitar una respuesta inmunitaria, preferentemente una respuesta a linfocitos T, en comparación con una proteína bouganina no modificada. La proteína bouganina madura es un polipéptido sencillo de 250 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 26.200 Da [Den Hartog y col (2002) Eur. J. Biochem. 269: 1772-1779; Patente de Estados Unidos N° 6.680.296]. La bouganina es una proteína inactivadora de ribosomas de tipo 1 (RIP) aislada originalmente de la planta *Bougainvillea spectabilis Willd* [Bolognesi y col (1997) Planta 203: 422-429]. Las RIP de plantas son ARN N-glucosidasas que despurinan los ARN ribosómicos principales de las células, por lo tanto lesionando los ribosomas y conduciendo a un cese de la síntesis de proteínas y muerte celular.

La secuencia de aminoácidos de la proteína bouganina madura (representada en un código de una letra) es:

**YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT
SKLFPGVTNRVTLTFDGSYQKLVNAKVDRKDLELGVYKLEFSIEAIH
GKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVD RGLYGSFKPNFKVL
NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWV VNKVSQISPD
MGILKFKSSK [SEC ID N°: 1].**

La expresión "proteína bouganina modificada" significa una proteína bouganina que no se ha modificado para reducir su propensión a suscitar una respuesta inmunitaria. La secuencia de la bouganina natural o una no modificada se muestra en SEC ID N°: 1. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que la expresión "bouganina no modificada" también incluye modificaciones de la SEC ID N°: 1 siempre que dichas modificaciones no reduzcan la propensión para suscitar una respuesta inmunitaria. Como ejemplos de modificaciones que pueden realizarse con la

SEC ID N°: 1 se incluyen fragmentos peptídicos y sustituciones de aminoácidos conservativas que no reducen la inmunogenicidad de la proteína.

La expresión "proteína bouganina modificada" significa una proteína bouganina que se ha modificado en comparación con la proteína bouganina no modificada (descrita anteriormente) en la que dicha modificación reduce la propensión de la bouganina a suscitar una respuesta inmunitaria. La proteína bouganina modificada también puede denominarse bouganina desinmunizada. La "proteína bouganina modificada" puede ser una secuencia de longitud completa modificada o un fragmento modificado de la proteína bouganina no modificada. La "proteína bouganina modificada" también puede contener otros cambios en comparación con la secuencia de bouganina natural que no modifica la inmunogenicidad del péptido. La proteína bouganina modificada tendrá preferentemente la misma actividad biológica que la bouganina no modificada.

La expresión "propensión reducida para suscitar una respuesta inmunitaria" como se usa en el presente documento significa que la proteína bouganina modificada es menos inmunogénica que la bouganina no modificada.

La expresión "respuesta inmunitaria" incluye respuestas inmunitarias tanto celulares como humorales. En una realización preferida, la bouganina modificada tiene una propensión reducida para activar linfocitos T.

La expresión "propensión reducida para activar linfocitos T humanos" como se usa en el presente documento significa que la proteína bouganina modificada tiene una propensión reducida para activar linfocitos T humanos en comparación con la proteína bouganina no modificada. Un experto en la técnica puede ensayar si una proteína modificada tiene una propensión reducida o no para activar linfocitos T usando ensayos conocidos en la técnica que incluyen evaluar el índice de estimulación de la proteína.

La expresión "índice de estimulación" como se usa en el presente documento se refiere a medir la capacidad de la proteína bouganina modificada o no modificada para activar linfocitos T humanos. Por ejemplo, la proteína bouganina modificada o no modificada, o péptidos de la misma, pueden ensayarse con respecto a su capacidad para provocar una respuesta proliferativa en linfocitos T humanos cultivados *in vitro*. Cuando este tipo de estrategias se realiza usando linfocitos T humanos sin tratar extraídos de donantes sanos, los autores de la invención han establecido que en la operación de dicho ensayo, un índice de estimulación igual a o mayor de 2,0 es una medición útil de proliferación inducida. El índice de estimulación deriva convencionalmente por división de la puntuación de proliferación (por ejemplo recuentos por minuto de radiactividad si se usa incorporación de ³H-timidina) medido en el péptido de ensayo mediante la puntuación medida en células no puestas en contacto con un péptido de ensayo.

En una realización, la invención proporciona una proteína bouganina modificada en la que la proteína bouganina modificada tiene una actividad biológica y tiene una propensión reducida para activar linfocitos T humanos en comparación con una proteína bouganina no modificada.

En otra realización, la invención proporciona una proteína bouganina modificada, en el que la proteína bouganina modificada tiene una propensión reducida para activar linfocitos T humanos en comparación con una proteína bouganina no modificada y tiene actividad biológica que es menor que la proteína bouganina no modificada. En otra realización adicional, la invención proporciona una proteína bouganina modificada en la que la proteína bouganina modificada tiene una propensión reducida para activar linfocitos T humanos y no actividad biológica. Dichas proteínas modificadas pueden, por ejemplo, usarse como controles, en ensayos o para hacer sujetos tolerantes.

La expresión "actividad biológica" como se usa en el presente documento es la capacidad de la proteína bouganina modificada o no modificada para inhibir la síntesis de proteína en ribosomas, que puede evaluarse de diversas maneras. Debe observarse que una proteína bouganina modificada tendrá aún una actividad biológica incluso si dicha actividad disminuye en comparación con la de la proteína no modificada, sin embargo será necesario tener algún nivel de actividad detectable. Por ejemplo, la actividad biológica de la proteína bouganina modificada o no modificada puede evaluarse identificando su actividad N-glucosidasa, y en particular con suficiente actividad para proporcionar una inhibición significativa de la traducción de la proteína. Un ensayo adecuado de este tipo implica ensayar la actividad de las proteínas bouganina variantes en comparación con la bouganina no modificada en un ensayo de síntesis de proteína acelular. Una mezcla de transcripción/traducción acoplada que contiene metionina, un ADN que codifica la proteína indicadora luciferasa y diluciones en serie de la proteína bouganina no modificada y modificada se coinubaban. Los niveles de luciferasa traducida se detectan fácilmente usando un contador luminiscente después de la adición de un reactivo de sustrato. La luminiscencia medida es inversamente proporcional a la actividad N-glucosidasa de la bouganina presente en la reacción. Es habitual proporcionar un control negativo tal como una proteína bouganina inactiva, por ejemplo que contenga una sustitución Y70A.

En una realización preferida, el péptido bouganina modificado se modifica en uno o más epítomos de linfocitos T en la secuencia de la proteína bouganina.

El término "epítomo de linfocitos T" significa una secuencia de aminoácidos que puede unirse al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II, que puede estimular linfocitos T y/o también puede unirse (sin necesariamente activación medible) a linfocitos T en el complejo con MHC de clase II.

En un aspecto, un procedimiento general que puede usarse en la presente invención que conduce a las proteínas bouganinas modificadas que comprenden epítomos de linfocitos T modificados comprende las siguientes etapas:

- (i) determinar la secuencia de aminoácidos de la proteína o parte de la misma;
- (ii) identificar uno o más posibles epítomos de linfocitos T dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína mediante procedimientos tales como determinación de la unión de los péptidos a moléculas MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos;
- (iii) diseñar variantes de secuencia nueva con uno o más aminoácidos en los posibles epítomos de linfocitos T identificados modificados de tal manera que reduzcan sustancialmente o eliminen la actividad del epítomo de linfocito T como se determina mediante la unión de los péptidos a moléculas MHC usando técnicas *in vitro* o *in silico* o ensayos biológicos. Dichas variantes de secuencia se crean de tal manera que se impide la creación de nuevo potencial de epítomos de linfocitos T mediante variaciones de secuencia a menos que dichos nuevos epítomos de linfocitos T potenciales se modifiquen a su vez de tal manera que se reduzca sustancialmente o se elimine la actividad del epítomo de linfocito T;
- (iv) construir dichas variantes de secuencia mediante técnicas de ADN recombinante y ensayar dichas variantes para identificar una o más variantes con propiedades deseables de acuerdo con técnicas recombinantes bien conocidas; y
- (v) opcionalmente repetir las etapas (ii) a (iv).

En un ejemplo, la etapa (iii) se realiza por sustitución, adición o delección de restos de aminoácidos en cualquiera de los epítomos de linfocitos T en la proteína bouganina no modificada. En otro ejemplo, el procedimiento para elaborar la proteína bouganina modificada se realiza con referencia a la secuencia de proteína homóloga y/o modelación *in silico*.

La identificación de posibles epítomos de linfocitos T de acuerdo con la etapa (ii) puede realizarse de acuerdo con los procedimientos descritos previamente en la técnica. Se desvelan procedimientos adecuados en los documentos WO 98/59244; WO 98/52976; WO 00/34317; WO02/069232 y pueden usarse para identificar la propensión de unión de los péptidos derivados de bouganina a una molécula MHC de clase II. Para identificar péptidos biológicamente relevantes, los autores de la invención han desarrollado una estrategia que aprovecha los ensayos de proliferación de linfocitos T humanos *ex vivo*. Esta estrategia se ha demostrado que es un procedimiento particularmente eficaz y se ha implicado en el ensayo de las secuencias peptídicas derivadas de bouganina solapantes en un esquema para explorar y ensayar toda la secuencia de bouganina. Los péptidos sintéticos se ensayan con respecto a su capacidad para suscitar una respuesta proliferativa en linfocitos T humanos cultivados *in vitro*. Cuando este tipo de estrategia se realiza usando linfocitos T humanos sin tratar extraídos de donantes sanos, los autores de la invención han establecido que en la operación de tal ensayo, un índice de estimulación igual a o mayor de 2,0 es una medida útil de proliferación inducida. El índice de estimulación deriva convencionalmente por división de la puntuación de proliferación (por ejemplo recuentos por minutos de radiactividad si se usa incorporación de ³H-timidina) medido en el péptido de ensayo mediante la puntuación medida en células no puestas en contacto con un péptido de ensayo.

Por consiguiente, en los estudios de la presente invención, se usan 89 péptidos sintéticos de 15 oligómeros, (como se indica en la Tabla 1) en la proliferación de linfocitos T en ensayos con PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sin tratar (es decir sin sensibilización conocida a la bouganina). Se seleccionaron 20 muestras de PBMC de donantes para conseguir una cobertura óptima en alotipos del MHC de clase II. Las PBMC se estimularon con péptidos individuales en cultivos por triplicado durante 7 días antes de que se evaluase la proliferación por incorporación de ³H-timidina. Todos los péptidos se diluyeron a dos concentraciones diferentes: 1 µM y 5 µM. Los índices de estimulación (IE) se calcularon como la cantidad de ³H incorporado a las células, dividido entre la cantidad de ³H incorporado en controles simulados estimulados.

Este procedimiento ha identificado las regiones más inmunogénicas de la molécula de bouganina en seres humanos. Por consiguiente, en una realización específica, la proteína bouganina modificada está modificada en uno o más restos de aminoácidos en un epítomo de linfocitos T del grupo que consiste en:

- a) AKVDRKDLELGVYKL, denominada en el presente documento región epitópica R1 (SEC ID N°: 2);
- b) LGVYKLEFSIEAIHG, denominada en el presente documento región epitópica R2 (SEC ID N°: 3); y
- c) NGQEIAKFFLIVIQM, denominada en el presente documento región epitópica R3 (SEC ID N°: 4).

Estos epítomos de linfocitos T se han identificado basándose en el IE dado > de 2 en dos o más muestras PBMC donantes. Las secuencias peptídicas desveladas anteriormente representan la información crítica necesaria para la construcción de proteínas bouganina modificadas en las que uno o más de estos epítomos está comprometido.

En una realización de la invención, la proteína bouganina modificada de la invención tiene al menos un epítomo de linfocitos T eliminado. En otra realización, la proteína bouganina modificada de la invención tiene uno, dos o tres epítomos de linfocitos T eliminados. La invención también contempla una proteína bouganina modificada en la que se modifican de 1 a 9 restos de aminoácidos, preferentemente en el epítomo de linfocitos T. En otra realización, se modifican de 1 a 5 restos de aminoácidos. El término "modificado" como se usa en el presente documento significa que los restos de aminoácidos se han modificado por sustitución, adición o delección, preferentemente por sustitución, pero la proteína bouganina tiene una propensión reducida para activar linfocitos T humanos. En otra realización la proteína modificada tiene actividad biológica. Más preferentemente la proteína bouganina modificada

de la invención se modifica por sustitución en una posición correspondiente a cualquiera de los aminoácidos especificados en las secuencias (a), (b) o (c) anteriores.

5 Una realización de la presente invención comprende proteínas bouganina para las cuales los ligandos de MHC de clase II identificados dentro de cualquiera de los epítomos R1 – R3 se modifican de tal manera que se elimina la unión o de otra manera se reduce la cantidad de alotipos MHC a los que puede unirse el péptido. Los aminoácidos en las regiones R1 a R3 para eliminar la unión o de otra manera reducir el número de alotipos de MHC a los que puede unirse el péptido pueden modificarse por sustitución, adición o delección.

10 Para la eliminación de epítomos de linfocitos T, se realizan sustituciones de aminoácidos en puntos apropiados dentro de la secuencia peptídica predicha para conseguir una reducción o eliminación sustancial de la actividad del epítomo de linfocitos T. En la práctica, un punto apropiado iguala a una realización a una unión de un resto de aminoácido en uno de los bolsillos proporcionados en el surco de unión a MHC de clase II.

15 En una realización, la unión en el primer bolsillo de la hendidura en la posición denominada P1 o anclaje P1 del péptido se modifica. La calidad de la interacción de unión entre el resto de anclaje P1 del péptido y el primer bolsillo del surco de unión a MHC de clase II se reconoce como un determinante principal de afinidad de unión global para el péptido completo. Una sustitución apropiada en esta posición del péptido será para un resto menos fácilmente acomodado en el bolsillo, por ejemplo, sustitución en un resto más hidrófilo. Los restos de aminoácidos en el péptido en las posiciones que se consideran idénticas a unirse con otras regiones del bolsillo dentro de la hendidura de unión a MHC también se consideran y se encuentran bajo el ámbito de la presente invención.

20 Se entiende que las sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos sencillos dentro de un posible epítomo de linfocitos T son una vía preferida mediante la cual el epítomo puede eliminarse. Las combinaciones de modificaciones (es decir, sustituciones, delecciones y adiciones) dentro de un solo epítomo puede contemplarse y por ejemplo pueden ser particularmente apropiadas cuando epítomos individualmente definidos están en solapamiento entre sí como es el caso presente en las que las regiones R1 y R2 epitópicas solapan en 5 restos. Además, modificaciones de aminoácidos sencillos dentro de un epítomo proporcionado o en combinación con un solo epítomo pueden realizarse en las posiciones que se considera que no son idénticas con los “restos del bolsillo” con respecto al surco de unión de MHC de clase II, pero en cualquier punto con la secuencia peptídica. Pueden realizarse modificaciones con referencia a una estructura homóloga o procedimiento estructural producido usando técnicas *in silico* conocidas en este campo y pueden basarse en rasgos estructurales conocidos de la molécula de acuerdo con la presente invención. Todas dichas modificaciones pueden encontrarse dentro del ámbito de la presente invención.

30 Las regiones R1 y R3 epitópicas de la bouganina se analizaron con respecto a la indicación de los ligandos de MHC de clase II incluidas dentro de sus respectivas secuencias. Para este análisis se usó una herramienta informática que aprovechaba los esquemas indicados en los documentos WO 98/59244 y WO 02/069232. El programa informático estimula el proceso de la presentación de antígenos a nivel de la interacción de unión del péptido de MHC de clase II para proporcionar una puntuación de unión para cualquier secuencia peptídica proporcionada. Dicha puntuación se determina para muchos de los alotipos predominantes de MHC de clase II existentes en la población. Dado que este esquema puede ensayar cualquier secuencia peptídica, las consecuencias de las sustituciones, adiciones o delecciones de aminoácidos con respecto a la capacidad de un péptido para interactuar con un surco de unión a MHC de clase II pueden predecirse. Por consiguiente, pueden diseñarse nuevas composiciones de secuencia que contengan números de péptidos reducidos capaces de interactuar con MHC de clase II y por lo tanto actuar como epítomos de linfocitos T inmunogénicos.

45 Bajo este esquema en una realización de la invención sustituciones dentro de la región R1 epitópica comprenden cambios en las posiciones V123, D127 y/o E129. De manera similar para la región R2 epitópica, en una realización la sustitución es en una posición Y133. Este resto se encuentra dentro de la región de solapamiento entre R1 y R2 pero la sustitución en Y133 es suficiente para eliminar el ligando de MHC de clase II relacionado con R2 y no es suficiente para eliminar por sí mismo los ligandos de MHC de clase II relacionados con R1. Para la región R3 epitópica, en una realización de la invención las sustituciones son los restos E151 y/o I152.

50 En todos los casos las sustituciones son con respecto a uno o más restos de aminoácidos alternativos. El análisis de R1 con el programa informático de estimulación de MHC II indicó que los restos de aminoácidos 123, 127, 129 y 131 eran restos clave en este epítomo para la unión a moléculas de MHC II. El resto 123 es un sitio preferido para la mutación de la región R1 porque está en la superficie de la molécula, lejos del sitio activo y es variable en el alineamiento de secuencia RIP. Sin embargo, no todas las sustituciones produjeron una molécula activa, de ahí la necesidad de validar mutaciones en el ensayo de bioactividad. Por tanto, por ejemplo, dentro de R1, las sustituciones V123T, V123A y V123Q son ejemplos de sustituciones alternativas preferidas. Se descubrió que el resto 131 está absolutamente conservado en RIP y por lo tanto probablemente no es adecuado para la mutación. Los restos 127 y 129 no están muy conservados pero se encontró que solamente un número de restos limitados tenían un impacto sobre la unión de MHC II. Los conjuntos de sustituciones: D127G, D127A, E129Q y E129G también son sustituciones preferidas. Para R2, se observó que el resto 133 era posiblemente un candidato para anular la unión a MHC II y su localización de superficie aparente (según se determina por modelado) combinado con el hecho de que no está muy conservado a través de RIP hace que sea un buen candidato para la mutación. Se encontró que las sustituciones alternativas preferidas eran Y133N, Y133T, Y133A, Y133R, Y133D, Y133E, Y133Q, Y133G, Y133K, Y133H y Y133S. Para R3, los

restos de aminoácidos 152, 155 y 158 se identificaron como restos clave para la unión a MHC II. Sin embargo, los restos 155 y 158 son parte de un tramo hidrófobo altamente conservado lo que sugiere que su mutación podría no dar moléculas bioactivas. Se encontró que los restos mal conservados eran un candidato más probable. Para R3, los conjuntos de sustituciones: I152Q e I152A también eran sustituciones preferidas.

5 Por consiguiente, la invención proporciona una proteína bouganina modificada en la que la bouganina se modifica en una o más de X¹, X², X³, X⁴ o X⁵ de la siguiente manera:

- a) AKX¹DRKX²LX³LG VX⁴KL (región R1 epitópica, SEC ID N°: 5);
- b) LGVX⁴KLEFSIEAIHG (región R2 epitópica, SEC ID N°: 6); y
- c) NGQEX⁵AKFFLIVIQM (región R3 epitópica, SEC ID N°: 7)

10 en la que X¹ a X⁵ pueden ser cualquier aminoácido.

En una realización específica X¹ es T o A o Q; X² es G o A; X³ es Q o G; X⁴ es N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S; y X⁵ es Q o A (región R1 epitópica, SEC ID N°: 8; región R2 epitópica, SEC ID N°: 9; región R3 epitópica, SEC ID N°: 10).

15 Considerado en su conjunto puede recopilarse un conjunto de sustituciones más preferido basándose en estudio de mapeo epitópico inmunogénico usando ensayos de linfocitos T *ex vivo*, simulaciones de unión al péptido de MHC *in silico* y consideraciones estructurales a partir de análisis de homología de secuencia. Finalmente, si se prefiere una proteína bioactiva, puede realizarse entonces un ensayo de actividad *in vitro* en la proteína modificada que puede comprender una o más mutaciones múltiples.

20 Por consiguiente en otra realización la invención proporciona un péptido de bouganina modificado que comprende la secuencia de aminoácidos:

**YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT
SKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKX¹DRKX²LX³LG VX⁴KLEFSIEA
IHGKTINGQEX⁵AKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNF
KVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNKVSQI
SPDMGILKFKSSK**

en la que X¹ a X⁵ pueden ser cualquier aminoácido (SEC ID N°: 11).

En una realización preferida X¹ es T o A o Q; X² es G o A; X³ es Q o G; X⁴ es N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S; y X⁵ es Q o A (SEC ID N°: 12).

25 En una realización específica, la proteína bouganina modificada comprende la secuencia de aminoácidos:

**YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT
SKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKLEFSIEAIH
GKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVL
NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNKVSQISPD
MGILKFKSSK (SEC ID N°: 13).**

En otra realización adicional, la proteína bouganina modificada comprende la secuencia de aminoácidos:

**YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVGYYQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT
SKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVQKLEFSIEAIH
GKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVL
NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNKVSQISPD
MGILKFKSSK (SEC ID N°: 14).**

Los restos subrayados son restos sustituidos diferentes de la proteína bouganina modificada.

5 Como será obvio para el experto en la materia, puede llegarse a conjuntos alternativos de modificaciones en los que se consigue el objetivo de eliminar epítopos no deseados. Sin embargo, las secuencias resultantes permanecerían ampliamente homólogas con las proteínas específicas desveladas en el presente documento y por lo tanto se encontrarían dentro del ámbito de la presente invención. Las equivalencias químicas obvias con respecto a las secuencias desveladas por la presente invención también se contempla que se encuentran dentro del ámbito de la presente invención. Dichos equivalentes incluyen proteínas que realizan sustancialmente la misma función sustancialmente de la misma manera.

10 En otra realización la proteína bouganina modificada de la invención tiene 1, 2, 3, 4, 5 o más modificaciones de aminoácidos en los epítopos de linfocitos T de la proteína.

15 En una realización adicional, la proteína bouganina modificada de la invención cuando se somete a ensayo en un ensayo con linfocitos T provoca un índice de estimulación reducido en comparación con la proteína bouganina no modificada.

En una realización adicional de la invención, los epítopos de linfocitos T de la proteína bouganina se mapean usando un ensayo de linfocitos T y después se modifican de tal manera que basándose en el reensayo, en el ensayo de linfocitos T la proteína bouganina modificada suscita un índice de estimulación menor que el de la proteína bouganina no modificado, preferentemente el índice de estimulación es menor de 2,0.

20 Será evidente para un experto en la técnica que si la proteína bouganina modificada tiene actividad biológica sustancialmente reducida o no tiene, puede ser necesaria una modificación adicional por sustitución, adición o delección de restos de aminoácidos para reestablecer la actividad biológica de la proteína bouganina modificada. Sin embargo, dichas proteínas bouganinas modificadas que se han reducido sustancialmente o no tienen actividad biológica aún se incluyen dentro del ámbito de la invención y tienen utilidad como controles en ensayos o para la tolerización.

25 En una realización, la bouganina modificada está mutada en el resto tirosina en la posición 70 para producir una bouganina inactiva. En una realización específica, la tirosina en la posición 70 se sustituye con alanina. En una realización preferida, la bouganina modificada tiene la secuencia:

**YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVAVVGYQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT
SKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKVDKLELGVYKLEFSIEAIH
GKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVL
NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNKVSQISPD
MGILKFKSSK [SEC ID N°: 129].**

30 Bajo el esquema de la presente invención, los epítopos están comprometidos por mutación para dar como resultado secuencias que ya no pueden actuar como epítopos de linfocitos T. Es posible usar procedimientos de ADN recombinante para conseguir mutagénesis dirigida de las secuencias diana y muchas de estas técnicas se encuentran disponibles y son bien conocidas en la técnica. En la práctica, se producirán diversas proteínas bouganina modificadas y se ensayarán para las características funcionales inmunitarias deseadas. Es

particularmente importante cuando se realizan modificaciones de la secuencia de proteína que los cambios contemplados no introduzcan nuevos epítomos inmunogénicos. Este acontecimiento se impide en la práctica reensayando la secuencia contempladas con respecto a la presencia de epítomos y/o de ligandos de MHC de clase II mediante cualquier medio adecuado.

- 5 Las proteínas bouganina modificadas de la invención también pueden contener o pueden usarse para obtener o diseñar "peptidomiméticos". Los "peptidomiméticos" son estructuras que sirven como sustitutos para péptidos en interacciones entre moléculas (Véase Morgan y col (1989), Ann. Reports Med. Chem. 24: 243-252 para una revisión). Los peptidomiméticos incluyen estructuras sintéticas que pueden o no contener enlaces de aminoácidos y/o peptídicos pero conservan las características estructurales y funcionales de la proteína de la invención
10 incluyendo la actividad biológica y una propensión reducida para activar linfocitos T humanos. Los peptidomiméticos también incluyen peptoides, oligopeptoides (Simon y col (1972) Proc. Natl. Acad, Sci USA 89: 9367).

Los peptidomiméticos pueden diseñarse basándose en información obtenida por reemplazo sistemático de aminoácidos L por aminoácidos D, el reemplazo de cadenas laterales con grupos que tienen diferentes propiedades electrónicas y por reemplazo sistemático de enlaces peptídicos con reemplazos de enlace amida. Las limitaciones con formaciones locales también pueden incluirse para determinar requisitos conformacionales para la actividad de un peptidomimético candidato. Los miméticos pueden incluir enlaces amida isostéricos, o aminoácidos D para estabilizar o promover conformaciones de giro inverso y ayudar a estabilizar la molécula. Pueden usarse análogos de aminoácidos cíclicos para limitar restos de aminoácidos a estados particulares conformacionales. Los miméticos también pueden incluir miméticos de las estructuras secundarias de las proteínas de la invención. Estas estructuras
15 pueden modelar la orientación tridimensional de restos de aminoácidos en las conformaciones secundarias conocidas de las proteínas. También pueden usarse peptoides que son oligómeros de aminoácidos N-sustituidos y pueden usarse como motivos para la generación de bibliotecas químicamente diversas de nuevas moléculas.

Las moléculas de la presente invención pueden prepararse en cualquiera de las diversas formas pero más preferentemente se realizan aprovechando los procedimientos recombinantes rutinarios. Es un procedimiento
25 relativamente fácil el uso de secuencias de proteínas e información proporcionada en el presente documento para deducir un polinucleótido (ADN) que codifica cualquiera de las secuencias de proteína preferidas. Esto puede conseguirse por ejemplo usando herramientas informatizadas tales como el conjunto informático DNSstar [DNAstar Inc, Madison, WI, Estados Unidos] o similar. Cualquiera de dichas secuencias de ADN con la capacidad de codificar los polipéptidos preferidos de la presente invención u homólogos significativos de los mismos, debe considerarse
30 como realizaciones de la presente invención.

Como un esquema general, los genes que codifican cualquiera de las secuencias de proteína de bouganina modificadas preferidas pueden prepararse usando genes sintéticos y clonarse en un vector de expresión adecuado. En su lugar, el vector de expresión se introduce en una célula huésped y las células se seleccionan y se cultivan. Las proteínas de la invención se purifican del medio de cultivo y se formulan en una preparación para administración
35 terapéutica. Como alternativa, puede obtenerse una secuencia génica de bouganina de tipo silvestre por ejemplo después de una estrategia de clonación de ADNc usando ARN preparado de tejidos radiculares de la planta *Bougainvillea spectabilis Willd.* El gen natural puede usarse como un molde para secuencias de variante preferidas para mutagénesis y construcción. En este sentido, es particularmente conveniente el uso de la estrategia de "PCR de extensión solapante" como describen Higuchi y col [Higuchi y col (1988) Nucleic Acids Res. 16: 7351] aunque pueden
40 aplicarse fácilmente otras metodologías y sistemas.

La actividad biológica de las proteínas de la invención puede también evaluarse de muchas maneras. En una realización, las moléculas de bouganina modificadas se identifican con actividad N-glucosidasa y en particular con una suficiente actividad para proporcionar inhibición significativa de la traducción de las proteínas. Un ensayo de este tipo adecuado implica ensayar la actividad de las proteínas bouganina modificadas en comparación con bouganinas no
45 modificadas en un ensayo de síntesis de proteínas acelular. Una mezcla de transcripción/traducción acoplada que contiene metionina, un ADN que codifica la proteína indicadora luciferasa y diluciones en serie de proteínas bouganina no modificadas y modificadas se incuban. Los niveles de luciferasa traducida se detectan fácilmente usando un contador de luminiscencia después de la adición de un reactivo de sustrato. La luminiscencia medida es inversamente proporcional a la actividad N-glucosidasa de la bouganina presente en la reacción. Es usual proporcionar un control
50 negativo tal como una proteína bouganina inactiva que contenga por ejemplo una sustitución Y70A.

La constitución de las moléculas de bouganina preferidas y activas puede conseguirse por técnicas de ADN recombinante y estas incluyen moléculas de bouganina fusionadas con el anticuerpo deseado u otros restos diana. Los procedimientos para purificar y manipular proteínas recombinantes que incluyen proteínas de fusión son bien conocidos en la técnica. Se explican técnicas necesarias completamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A
55 Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., eds., 1994); "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan y col.,
60 eds., 1991).

Las proteínas y péptidos de la invención pueden prepararse usando un procedimiento de ADN recombinante. Las proteínas de la invención también pueden prepararse por síntesis química usando técnicas bien conocidas en la química de proteínas tal como síntesis en fase sólida (Merrifield, 1964, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149-2154) o síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, 1987, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart).

La presente invención también proporciona una molécula de ácido nucleico purificada y aislada que comprende una secuencia que codifica las proteínas o péptidos de bouganina modificados de la invención, preferentemente una secuencia que codifica la proteína descrita en el presente documento como SEC ID N°: 13 o SEC ID N°: 14.

La expresión "aislado y purificado" como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetizan químicamente. Un ácido nucleico "aislado y purificado" está también sustancialmente libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) a partir del cual deriva el ácido nucleico.

La expresión "ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de nucleótidos o monómeros nucleosídicos que consisten en bases de origen natural o azúcares y enlaces interazúcar (estructurales). El término también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros que no son de origen natural o partes de los mismos que actúan de manera similar. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden ser ácido ribonucleico (ARN) o desoxirribonucleico (ADN) y pueden contener bases de origen natural que incluyen adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas tales como xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo, 2-propilo, y otras alquil adeninas, 5-halo uracilo, 5-halo citosina, 6-aza uracilo, 6-aza citosina y 6-aza timina, pseudo uracilo, 4-tiouracilo, 8-halo adenina, 8-amino adenina, 8-tiol adenina, 8-tio-alquil adeninas, 8-hidroxil adenina y otras adeninas 8 sustituidas, 8-halo guaninas, 8-amino guanina, 8-tiol guanina, 8-tioalquil guaninas, 8-hidroxil guanina y otras guaninas 8 sustituidas, otros uracilos aza o deaza, timidinas, citosinas, adeninas o guaninas, 5-trifluorometil uracilo y 5-trifluoro citosina.

En una realización, la molécula de ácido nucleico purificada y aislada comprende una secuencia que codifica las proteínas o péptidos, preferentemente la SEC ID N°: 13 o SEC ID N°: 14 de la invención, que comprende

- (a) la secuencia de ácidos nucleicos en la que T también puede ser U;
- (b) las secuencias de ácido nucleico complementarias a (a);
- (c) las secuencias de ácido nucleico que son homólogas a (a) o (b);
- (d) un fragmento de (a) a (c) que tiene al menos 15 bases, preferentemente de 20 a 30 bases, y que se hibridará con (a) a (c) en condiciones de hibridación rigurosas; o
- (e) una molécula de ácido nucleico que difiere de cualquiera de los ácidos nucleicos de (a) a (c) en las secuencias de codón debido a la degeneración del código genético.

Además, se apreciará que la invención incluye moléculas de ácido nucleico que comprenden secuencias de ácido nucleico que tienen homología sustancial de secuencia con las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas y péptidos de la invención y fragmentos de los mismos. La expresión "secuencias que tienen homología sustancial de secuencia" significa las secuencias de ácido nucleico que tienen unas variaciones de secuencia ligeras o inconsecuentes a partir de estas secuencias, es decir las secuencias actúan substancialmente de la misma manera para producir proteínas funcionalmente equivalentes. Las variaciones pueden atribuirse a mutaciones locales o modificaciones estructurales.

Las secuencias de ácido nucleico que tienen homología sustancial incluyen secuencias de ácido nucleico que tienen al menos una identidad del 80 %, preferentemente del 90 % con la secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas y péptidos de la invención.

Otro aspecto de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico y fragmentos de la misma que tienen al menos 15 bases, que se hibridan con moléculas de ácido nucleico de la invención en condiciones de hibridación, preferentemente condiciones de hibridación rigurosas. Los expertos en la técnica conocen condiciones rigurosas apropiadas que promueven la hibridación del ADN o pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Por ejemplo, puede emplearse lo siguiente: cloruro de sodio 6,0/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido por un lavado de 2,0 x SSC a 50 °C. La rigurosidad puede seleccionarse basándose en las condiciones usadas en la etapa de lavado. Por ejemplo, la concentración salina en la etapa de lavado puede seleccionarse de una elevada rigurosidad de aproximadamente 0,2 x SSC a 50 °C. Además, la temperatura de la etapa de lavado puede ser a condiciones de alta rigurosidad, aproximadamente 65 °C.

Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención tienen una secuencia que codifica una proteína o un péptido de la invención que puede incorporarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica en un vector de expresión apropiado que garantice la buena expresión de la proteína o polipéptido. Como posibles vectores de expresión se incluyen pero sin limitación, cósmidos, plásmidos o virus modificados (por ejemplo retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adenoasociados), siempre que el vector sea compatible con la célula huésped usada. La expresión de "vectores adecuados para la transformación de una célula huésped" significa que los

vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped para usar para la expresión, que están unidos operativamente a la molécula de ácido nucleico. Por “unido operativamente” se entiende que el ácido nucleico está unido a secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión del ácido nucleico.

- 5 Por lo tanto la invención contempla un vector de expresión recombinante de la invención que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína insertada. Las secuencias reguladoras adecuadas podían derivar de diversas fuentes incluyendo genes bacterianos, fúngicos o virales (por ejemplo véase las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). La selección de secuencias reguladoras apropiadas es dependiente de la célula huésped seleccionada y puede conseguirse fácilmente por un experto habitual en la técnica. Como ejemplos de dichas secuencias reguladoras incluyen: un promotor transcripcional y un potenciador o una secuencia de unión a ARN polimerasa, una secuencia de unión ribosómica, que incluye una señal de inicio de la traducción. Adicionalmente, dependiendo de la célula huésped seleccionada y del vector empleado, pueden incorporarse otras secuencias tales como un origen de replicación, sitios adicionales de restricción de ADN, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de la transcripción en el vector de expresión. También se apreciará que las secuencias reguladoras necesarias pueden proporcionarse por la proteína natural y/o sus regiones flanqueantes.

- Los vectores de expresión recombinantes de la invención también pueden contener un gen marcador de selección que facilita la selección de células huésped transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Son ejemplos de genes marcadores de selección los genes que codifican una proteína tal como G418 e higromicina que confiere resistencia a determinados fármacos, β -galactosidasa, acetiltransferasa cloranfenicol o luciferasa de luciérnaga. La transcripción del gen marcador de selección se controla por cambios en la concentración de la proteína marcadora de selección tal como β -galactosidasa, acetiltransferasa cloranfenicol o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador de selección codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos tal como resistencia a neomicina, pueden seleccionarse células transformantes con G418. Las células que tienen incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras morirán. Esto hace que sea posible visualizar y someter a ensayo con respecto a la expresión de vectores de expresión recombinantes de la invención y en particular determinar el efecto de una mutación sobre la expresión y fenotipo. Se apreciará que los marcadores de selección pueden introducirse en un vector individual del ácido nucleico de interés.

- Los vectores de interés recombinantes también pueden contener genes que codifican un resto de fusión que proporcione una mayor expresión de la proteína recombinante; una mayor solubilidad de la proteína recombinante y ayudar en la purificación de una proteína recombinante diana actuando como un ligando en la purificación por afinidad. Por ejemplo, puede añadirse un sitio de escisión proteolítico a la proteína recombinante diana para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión posterior a purificación de la proteína de fusión.

- Pueden introducirse vectores de expresión recombinantes en células huésped para producir una célula huésped transformada. Se pretende que la expresión “célula huésped transformada” incluya células procariotas y eucariotas que se han transformado o transfectado con un vector de expresión recombinante de la invención. Se pretende que las expresiones “transformado con”, “transfectado con”, “transformación” y “transfección” incluyan la introducción de ácido nucleico (por ejemplo un vector) en una célula mediante cualquiera de muchas posibles técnicas conocidas en la materia. Las células procariotas pueden transformarse con ácido nucleico por ejemplo mediante electroporación o transformación mediada con cloruro de calcio. Puede introducirse ácido nucleico en células de mamífero mediante técnicas convencionales tales como fosfato cálcico o precipitación con cloruro de calcio, transfección mediada con DEAE dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. En Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)), y otros libros de texto de laboratorio pueden encontrarse procedimientos adecuados para la transformación y transfección de células huésped.

Las células huésped adecuadas incluyen una amplia diversidad de células procariotas y eucariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden expresarse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto (usando baculovirus), células de levadura o células de mamífero. En Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991) pueden encontrarse otras células huésped adecuadas.

- Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, ADN para una presecuencia o una secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si este se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si influye en la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado para facilitar la traducción. Generalmente, la expresión “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contigua en una fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. El engarce se consigue mediante ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o engarzadores oligonucleotídicos sintéticos se usan de acuerdo con la práctica convencional.

60

En algunas realizaciones el vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una bouganina modificada con un número reducido de epítomos de linfocitos T posibles unidos operativamente a una secuencia de control de expresión. En diversas realizaciones el vector de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica las proteínas o péptidos de la invención, o una variante degenerada de la misma y comprenderá al menos el dominio que codifica la RIP de dichos ácidos nucleicos unidos operativamente con un control de expresión adecuado y secuencias de selección. La degeneración en relación a polinucleótidos se refiere al hecho de que se reconocerá que en el código genético se especifican muchos aminoácidos en más de un codón. La degeneración del código representa 20 aminoácidos diferentes codificados por 64 secuencias triplete posibles de las cuatro diferentes bases que comprenden ADN.

El término "domino que codifica RIP" o "dominio que codifica la Proteína Inactivadora de Ribosomas" como se usa en el presente documento significa el dominio funcional que proporciona a la bouganina su actividad biológica.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención también pueden sintetizarse químicamente usando técnicas convencionales. Se conocen diversos procedimientos para la síntesis química de polidesoxinucleótidos incluyendo síntesis en fase sólida que, al igual que la síntesis peptídica, se ha automatizado por completo en sintetizadores de ADN disponibles en el mercado (véase, por ejemplo Itakura y col. Patente de Estados Unidos N° 4.598.049; Caruthers y col. Patente de Estados Unidos N° 4.458.066; e Itakura Patente de Estados Unidos N° 4.401.796 y 4.373.071).

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión que comprenden una nueva proteína de la invención y una proteína seleccionada o una proteína marcadora de selección.

Otro aspecto de la presente invención es una célula cultivada que comprende al menos uno de los vectores mencionados anteriormente.

Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento para preparar la bouganina modificada que comprende cultivar la célula mencionada anteriormente en condiciones que permitan la expresión de la bouganina modificada del vector de expresión y purificar la bouganina de la célula.

(B) Citotoxinas bouganina modificadas:

Como se ha mencionado anteriormente, la bouganina es una proteína inactivadora ribosómica de tipo 1 (RIP) que despurina el principal ARN ribosómico de células conduciendo al cese de la síntesis de proteínas y la muerte celular. Como tales, las bouganinas modificadas de la invención pueden usarse para preparar citotoxinas. Las citotoxinas que contienen una proteína bouganina modificada se prefieren sobre citotoxinas que contienen una proteína bouganina no modificada ya que la primera es menos inmunogénica y probablemente destruirá menos el sistema inmunitario antes de que alcance su diana.

Por consiguiente, la presente invención también proporciona una citotoxina que comprende (a) un resto diana unido a (b) una proteína bouganina modificada de la invención.

La expresión "proteína bouganina modificada de la invención" se usa para facilidad de referencia e incluye cualquiera y todas las proteínas bouganinas modificadas descritas en el presente documento tal como las proteínas bouganinas modificadas descritas anteriormente en la Sección (A) así como en las figuras y ejemplos.

La expresión "resto diana" como se usa en el presente documento se refiere a un sustrato, medios, o técnicas de administración de la proteína bouganina modificada a una célula diana. En una realización el resto diana es un anticuerpo. En una realización, el resto diana puede ser un liposoma. En una realización el liposoma puede unirse a un anticuerpo. En otra realización el resto diana es una proteína que puede dirigir una interacción de unión específica con una célula diana particular. Dichos restos de proteína incluyen una diversidad de ligandos polipeptídicos para los cuales existen receptores de superficie celular específicos e incluyen por lo tanto numerosas citocinas, hormonas peptídicas y polipeptídicas y otros modificadores de la respuesta biológica. Ejemplos destacables incluyen dichas proteínas como factor de crecimiento epitelial vascular, factor de crecimiento epidérmico, herregulina, las interleucinas, interferones, factor de necrosis tumoral y otras moléculas de proteínas y glucoproteínas. Las proteínas de fusión de estas y otras moléculas con bouganina de la presente invención pueden contemplarse y puede comprender el resto de bouganina modificado bien en la orientación en el extremo N o bien en el extremo C con respecto al dominio del ligando de la proteína. El resto diana puede unirse directamente a las proteínas de la invención o a través de un engarce. En una realización, el engarce es un engarce peptídico o un engarce químico. Del mismo modo, la reticulación química del ligando purificado con la proteína bouganina modificada puede contemplarse y se encuentra dentro del ámbito de la presente invención.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una citotoxina que comprende (a) un ligando que se une a una célula cancerosa unida a; (b) una proteína bouganina modificada de la invención.

El ligando puede ser cualquier molécula que se una a una célula cancerosa que incluya, pero sin limitación, proteínas. En una realización, el ligando es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que reconoce la superficie de una célula cancerosa.

Por consiguiente, las citotoxinas de la presente invención pueden usarse para tratar diversas formas de cáncer tales como cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer pulmonar microcítico y no microcítico, sarcomas, gliomas, linfomas de linfocitos T y B.

5 En una realización, el ligando que se une a una célula cancerosa comprende una molécula de inmunoglobulina completa que se une a la célula cancerosa. Cuando un ligando de unión a la célula cancerosa es un anticuerpo o un fragmento del mismo, a la citotoxina se la puede denominar inmunotoxina. En otra realización, el ligando que se une a la célula cancerosa es un dímero de fragmentos de anticuerpo Fab, Fab', scFv, de un solo dominio o fragmentos Fv estabilizados con puentes disulfuro. En otra realización, el anticuerpo contra el cáncer comprende una cadena pesada variable, una cadena ligera variable, un fragmento de anticuerpo de un solo dominio Fab, Fab', scFv o un fragmento Fv estabilizado con puentes disulfuro. Las partes del ligando que se une a la célula cancerosa puede derivar de una o más especies, preferentemente comprendiendo las partes derivadas de la especie humana y más preferentemente son completamente humanas o humanizadas. Las regiones diseñadas para facilitar la purificación o para la conjugación con la toxina también pueden incluirse o añadirse en la parte de unión a la célula cancerosa.

15 En una realización particular, el ligando de unión a la célula cancerosa reconoce Ep-CAM. Ep-CAM (por Molécula de Adhesión Celular Epitelial, también conocida como 17-1A, KSA, EGP-2 y GA733-2) es una proteína transmembrana que se expresa altamente en muchos tumores sólidos, incluyendo carcinomas de pulmón, de mama, ovario, colorrectal y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, pero expresada débilmente en la mayoría de los tejidos epiteliales normales.

20 Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona una citotoxina bouganina modificada dirigida a Ep-CAM-que comprende (a) un ligando (tal como un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo) que se une a Ep-CAM sobre la célula cancerosa unida a (b) una proteína bouganina modificada que tiene un propensión reducida para activar linfocitos T en comparación con una proteína bouganina no modificada.

25 En una realización específica, la citotoxina comprende (a) un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo que se une al dominio extracelular de Ep-CAM humano y comprende las secuencias de la región determinante de la complementariedad (CDR) derivada de un anticuerpo MOC-31 unido a: (b) una proteína bouganina modificada que tiene una propensión reducida para activar linfocitos T en comparación con una proteína bouganina no modificada.

30 Las bouganinas modificadas dirigidas a Ep-CAM adecuadas de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, VB6-845 y variantes de la misma, otras citotoxinas que comprenden otras inmunoglobulinas de cadena sencilla o doble que se unen selectivamente a Ep-CAM o variantes de las mismas. La expresión "VB6-845" como se usa en el presente documento significa una citotoxina que comprende una versión Fab de un anticuerpo scFv anti-Ep-CAM unido a una forma modificada de bouganina, Bou 156 (SEC ID N°: 13). La secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de la VB6-845 se observa en la Figura 3B (SEC ID N°: 16 y SEC ID N°: 15, respectivamente).

35 En otra realización, el ligando que se une a la célula cancerosa reconoce un antígeno asociado a tumores que se encuentra específicamente en células neoplásicas y no en células normales. En una realización preferida, el ligando es un anticuerpo que se une a un antígeno asociado a tumor. El anticuerpo anti antígeno asociado a tumor reconoce específicamente células cancerosas de una amplia diversidad de cánceres pero no reconoce células normales no cancerosas.

40 Por consiguiente en otra realización, la invención proporciona una citotoxina que comprende (a) un ligando (tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno asociado a tumor en la célula cancerosa unida a; (b) una proteína bouganina modificada que tiene una proporción reducida para activar linfocitos T en comparación con una proteína bouganina no modificada.

45 Las bouganinas modificadas dirigidas a antígenos asociados con tumores adecuados de la invención incluyen, sin limitación, VB6-011 y sus variantes, otras citotoxinas que comprenden otras inmunoglobulinas de cadena sencilla o doble que se unen selectivamente a antígenos asociados con tumores o variantes de los mismos. El término "VB6-011" como se usa en el presente documento significa una citotoxina que comprende una versión Fab del anticuerpo monoclonal humano H11 vinculado genéticamente a una forma modificada de bouganina, BOU 156 (SEC ID N°: 13). El anticuerpo H11 se obtiene por la fusión de linfocitos de sangre periférica de un paciente con cáncer de 64 años fusionados con una línea celular de mieloma humana para producir hibridomas. El hibridoma NBGM1/H11 produce una IgM_k que se remodificó por ingeniería genética en un formato Fab para elaborar VB6-011 (véanse los documentos US 6.207.153 o WO 97/44461 para más detalle de la preparación del hibridoma secretor del anticuerpo H11). La secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos de VB6-011 se muestra en la Figura 15 (SEC ID N°: 28 y SEC ID N°: 27, respectivamente).

55 En una realización no limitante específica, la citotoxina comprende VB6-845 (Figura 3B, SEC ID N°: 16) o VB6-011 (Figura 15, SEC ID N°: 28). En otras realizaciones no limitantes, la citotoxina comprende una variante de VB6-845 o VB6-011.

Una variante VB6-845 se une al mismo epítipo Ep-CAM o a un epítipo EP-CAM sustancialmente similar que está unido mediante VB6-845, y la variante pueden inhibir de manera competitiva la unión de VB6-845 con Ep-CAM en

condiciones fisiológicas en al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. Una variante VB6-845 puede comprender la misma bouganina modificada que VB6-845 o puede comprender una bouganina diferente modificada de la invención. En otra realización no limitante, la citotoxina comprende una parte de unión a Ep-CAM que comprende la región variable de MOC31, o una variante de la misma. En otra realización adicional, la citotoxina comprende una parte de unión a Ep-CAM que comprende 4D5MOCB o una variante de la misma. La unión de cualquiera de estas citotoxinas a Ep-CAM puede reducirse al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % por competición con el anticuerpo MOC31 o 4D5MOCB de referencia en condiciones fisiológicas.

Una variante VB6-011 se une al mismo epítipo antigénico asociado con tumor o a un epítipo antigénico asociado con tumor sustancialmente similar que está unido mediante VB6-011, y la variante puede inhibir competitivamente la unión de VB6-011 con un antígeno asociado a tumor en condiciones fisiológicas en al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. Una variante VB6-011 puede comprender la misma bouganina modificada que VB6-011 o puede comprender una bouganina modificada diferente de la invención. En otra realización no limitante, la citotoxina comprende una parte de unión a antígeno asociada a tumor que comprende el anticuerpo monoclonal H11, fragmentos de unión a antígeno H11 o variante de los mismos. La unión de cualquiera de estas citocinas a VB6-011 puede reducirse al menos el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % por competición con el anticuerpo H11 de referencia en condiciones fisiológicas.

En una realización preferida, la afinidad de unión de la parte de unión a Ep-CAM o la parte de unión a antígeno asociado a tumor es al menos cuatro órdenes de magnitud, preferentemente al menos tres órdenes de magnitud, más preferentemente menos de dos órdenes de magnitud de la afinidad de unión de VB6-845 o VB6-011 respectivamente medido por técnicas de laboratorio convencionales. En realizaciones no limitantes, la parte de unión a Ep-CAM puede bloquear competitivamente la unión de un anticuerpo anti-Ep-CAM conocido tal como, pero sin limitación, PANOREX[®] o MT201, a Ep-CAM en condiciones fisiológicas, al menos el 0,1 %, 1 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %. En realizaciones no limitantes, la parte de unión a antígeno asociada a tumor puede bloquear competitivamente la unión de un anticuerpo de la unión de un anticuerpo anti antígeno asociado a tumor, tal como, pero sin limitación, H11, a un antígeno asociado a tumor, en condiciones fisiológicas en al menos el 0,1 %, 1 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %.

El experto en la técnica podrá apreciar que pueden identificarse restos determinantes de especificidad. La expresión "restos determinantes de especificidad" conocidos también como "SDR" se refiere a un resto que forma parte del parátipo de un anticuerpo, particularmente restos CDR, la sustitución individual mediante la cual alanina, independientemente de cualquier otra mutación, disminuye la afinidad del anticuerpo por el epítipo en al menos 10 veces, preferentemente al menos 100 veces, más preferentemente al menos 1000 veces. Esta pérdida de afinidad destaca la importancia del resto en cuanto a la capacidad del anticuerpo para unirse al epítipo. Véase, por ejemplo, Tamura y col., 2000, "Structural correlates of an anticarcinoma antibody: identification of specificity-determining residues (SDRs) and development of a minimally immunogenic antibody variant by retention of SDRs only," J. Immunol. 164(3): 1432-1441.

El efecto de mutaciones sencillas o múltiples sobre la actividad de unión, particularmente sobre la afinidad de unión, puede evaluarse al mismo tiempo para evaluar la importancia de una serie particular de aminoácidos sobre la interacción de unión (por ejemplo, la contribución de la CDR2 de cadena ligera o pesada a la unión). Los efectos de una mutación de aminoácidos también pueden evaluarse secuencialmente para evaluar la contribución de un solo aminoácido cuando se evalúa individualmente. Dichas evaluaciones pueden realizarse, por ejemplo, mediante una exploración de saturación *in vitro* (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N^o 6.180.341; Hilton y col., 1996, "Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor," J Biol Chem. 271: 4699-4708) y mutagénesis dirigida (véase, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis," Science 244: 1081-1085; Bass y col., 1991, "A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor," Proc Natl Acad Sci. USA 88: 4498-4502). En la técnica de mutagénesis mediante exploración de alanina, se introducen mutaciones sencillas de alanina en restos múltiples en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se someten a ensayo con respecto a la actividad biológica para identificar restos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

También pueden identificarse sitios de receptor a ligando u otras interacciones biológicas mediante análisis físico de estructura determinado mediante, por ejemplo, resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje con fotoafinidad, junto con la mutación de supuestos aminoácidos de sitios de contacto (véase, por ejemplo de Vos y col., 1992, "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex," Science 255: 306-312; Smith y col., 1992, "Human interleukin 4. The solution structure of a four-helix bundle protein," J Mol Biol. 224: 899-904; Wlodaver y col., 1992, "Crystal structure of human recombinant interleukin-4 at 2.25 Å resolution," FEBS Lett. 309: 59-64). Adicionalmente, la importancia de aminoácidos individuales particulares o series de aminoácidos, pueden evaluarse por comparación con la secuencia de aminoácidos de polipéptidos relacionado o sitios de unión a análogos.

Adicionalmente, el experto en la materia podrá apreciar que el aumento de avidez puede compensar una afinidad de unión menor. La avidez de una citotoxina por un receptor de una célula cancerosa es una medida de la fuerza de la unión de la parte de unión a Ep-CAM de Ep-CAM, que tiene múltiples sitios de unión. La fuerza de unión funcional entre Ep-CAM y la parte de unión a Ep-CAM representa la suma de la fuerza de todas las uniones de afinidad y por tanto un componente individual puede unirse con relativamente baja afinidad, pero un multímero de dichos componentes puede demostrar un fuerte efecto biológico. De hecho, las interacciones múltiples entre los sitios de unión a Ep-CAM y epítomos Ep-CAM pueden demostrar ser mucho mayores que el efecto biológico aditivo es decir la ventaja de multivalencia puede ser de muchos órdenes de magnitud con respecto a la constante de equilibrio.

De manera similar, la avidez de una citotoxina por un receptor de células cancerosas es una medida de la fuerza de la parte de unión a antígeno asociada a tumor de un antígeno asociado a tumor, que puede tener sitios de unión múltiples. La fuerza de unión funcional entre un antígeno asociado a tumor y la parte de unión a antígeno asociado a tumor representa la suma de la fuerza de todos los enlaces de afinidad y por tanto un componente individual puede unirse con relativamente baja afinidad, aunque un multímero de dichos componentes puede demostrar un fuerte efecto biológico. De hecho, las interacciones múltiples entre sitios de unión a antígeno asociados a tumor y epítomos de antígeno asociados a tumor pueden demostrar ser mucho mayores que el efecto biológico aditivo, es decir, la ventaja de multivalencia puede ser de muchos órdenes de magnitud con respecto a la constante del equilibrio.

En una realización no limitante, la parte de unión a Ep-CAM tiene una estructura sustancialmente similar a la de 4D5MOCB. La estructura sustancialmente similar puede caracterizarse por referencia a mapas epitópicos que reflejan los puntos de unión de la parte de unión a Ep-CAM de citotoxinas con una molécula Ep-CAM. En otra realización no limitante, los mapas epitópicos pueden generarse para la parte de unión a antígeno asociada con tumor y una estructura sustancialmente similar puede caracterizarse por referencia a mapas epitópicos que reflejen los puntos de unión de la parte de unión a antígeno asociada a tumor de la citotoxina con una molécula de antígeno asociada a tumor.

Las citotoxinas de la presente invención pueden prepararse mediante síntesis química usando técnicas bien conocidas en la química de proteínas tales como síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Assoc. 85: 2149-2154 (1964)) o síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, Vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart (1987)). En una realización, el ligando de unión a cáncer y la bouganina modificada son ambas proteínas y pueden conjugarse usando técnicas bien conocidas en la materia. Existen varios cientos de reticulantes disponibles que pueden conjugarse dos proteínas. (Véase por ejemplo "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking". 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor). El reticulante se selecciona generalmente basándose en grupos funcionales reactivos disponibles o insertados en el ligando o toxina. Además, si no hay grupos reactivos, puede usarse un reticulante fotoactivable. En determinados casos, puede ser deseable incluir un espaciador entre el ligando y la toxina. Los agentes reticulantes conocidos en la técnica incluyen los agentes homobifuncionales: glutaraldehído, dimetiladipimidato y Bis(diazobencidina) y los agentes heterobifuncionales: m Maleimidobenzoil-N-Hidroxisuccinimida y Sulfo-m Maleimidobenzoil-N-Hidroxisuccinimida.

También puede prepararse una proteína de fusión a toxina bouganina-ligando usando técnicas de ADN recombinantes. En este caso, una secuencia de ADN que codifica el ligando de unión a cáncer se fusiona con una secuencia de ADN que codifica la proteína bouganina modificada dando como resultado una molécula de ADN quimérica. La secuencia de ADN quimérica se transfecta en una célula huésped que expresa la proteína de fusión ligando-bouganina. La proteína de fusión puede recuperarse del cultivo celular y purificarse usando técnicas conocidas en la materia.

Pueden prepararse anticuerpos que tengan especificidad por proteínas de superficie celular tales como Ep-CAM y antígeno asociados a tumores mediante procedimientos convencionales. Un mamífero (por ejemplo un ratón, hámster o conejo) puede inmunizarse con una forma inmunogénica del péptido que suscita una respuesta de anticuerpo en el mamífero. Las técnicas para conferir inmunogenicidad en un péptido incluyen conjugación a vehículos u otras técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, el péptido puede administrarse en presencia de adyuvantes. El progreso de la inmunización puede monitorizarse por detección de titulaciones de anticuerpos en plasma o suero. Pueden usarse procedimientos de ELISA convencionales u otros inmunoensayos con el inmunógeno como antígeno para evaluar los niveles de anticuerpos. Después de la inmunización, puede obtenerse antisuero y, si se desea, los anticuerpos policlonales aislarse de los sueros.

Para producir anticuerpos monoclonales, células productoras de anticuerpos (linfocitos) pueden extraerse de un animal inmunizado y fusionarse con células de mieloma mediante procedimientos de fusión celular somática convencionales inmortalizando así estas células y proporcionando células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia, por ejemplo, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) así como otras técnicas tales como la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor y col., Immunol. Today 4: 72 (1983)), la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy Allen R., Bliss, Inc., páginas 77-96 (1985)) y exploración de bibliotecas de anticuerpos combinatorias (Huse y col., Science 246: 1275 (1989)). Las células de hibridoma pueden explorarse inmunoquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con el péptido y los anticuerpos monoclonales pueden aislarse.

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento pretende incluir anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo Fab y F(ab')₂, y anticuerpos monocatenarios (scFv)) y anticuerpo quiméricos que también reaccionan específicamente con un componente de la superficie de la célula. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales y los fragmentos pueden explorarse con respecto a la utilidad de la misma manera que la descrita anteriormente. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ pueden generarse tratando un anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. Los anticuerpos monocatenarios combinan las regiones de unión a antígeno de un anticuerpo en una cadena polipeptídica plegada de forma estable. Los anticuerpos monocatenarios pueden generarse por tecnología recombinante.

Los derivados de anticuerpos quiméricos, es decir moléculas de anticuerpo que se combinan con una región variable de animal no humano y una región constante humana también se contemplan dentro del alcance de la invención. Las moléculas de anticuerpo quiméricas pueden incluir, por ejemplo, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo de un ratón, rata u otras especies, con regiones constantes humanas. Pueden usarse procedimientos convencionales para fabricar anticuerpos quiméricos que contengan la región variable de inmunoglobulina que reconozca un antígeno de la superficie celular (Véase, por ejemplo Morrison y col., Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851 (1985); Takeda y col., Nature 314: 452 (1985), Cabilly y col., Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Boss y col., Patente de Estados Unidos N° 4.816.397; Tanaguchi y col., Patente E.P. N° 171.496; Patente Europea N° 173.494, Patente del Reino Unido N° GB 2177096B). Se espera que los anticuerpos quiméricos sean menos inmunogénicos en un sujeto humano que el anticuerpo no quimérico correspondiente. Los anticuerpos quiméricos pueden estabilizarse mediante el procedimiento descrito en Pluckthun y col., documento WO 00/61635.

Los anticuerpos monoclonales o quiméricos especialmente reactivos contra componentes de la superficie celular pueden adicionalmente humanizarse produciendo quimeras con región constante humana en cuyas partes de las regiones variables, particularmente las regiones marco conservadas del dominio de unión a antígeno, son de origen humano y solo las regiones hipervariables son de origen no humano. Dichas moléculas de inmunoglobulina pueden prepararse mediante técnicas conocidas en la materia, (por ejemplo Teng y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312 (1983); Kozbor y col., Immunology Today 4: 7279 (1983); Olsson y col., Meth. Enzymol., 92: 3-16 (1982), y Publicación PCT WO92/06193 o documento EP 239.400). Los anticuerpos humanizados también pueden producirse comercialmente (Scotgen Limited, 2 Holly Road, Twickenham, Middlesex, Gran Bretaña). Además, anticuerpos monoclonales o quiméricos específicamente reactivos contra componentes de la superficie celular pueden hacerse menos inmunogénicos reduciendo su número de posibles epítomos de linfocitos T.

Los anticuerpos específicos o fragmentos de anticuerpo reactivos contra componentes de la superficie celular también pueden generarse explorando bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o partes de las mismas, que se expresan en bacterias con componentes de superficie celular. Por ejemplo, fragmentos Fab completos, regiones VH y regiones Fv pueden expresarse en bacterias usando fagotecas de expresión (Véase por ejemplo Ward y col., Nature 341: 544-546 (1989); Huse y col., Science 246: 1275-1281 (1989); y McCafferty y col., Nature 348: 552-554 (1990)). Como alternativa, un SCID-hu de ratón, por ejemplo el modelo desarrollado por Genpharm, puede usarse para producir anticuerpos o fragmentos de los mismos.

En todos los casos en los que se crea una proteína de bouganina modificada en la fusión con una secuencia de anticuerpo es más deseable utilizar secuencias de anticuerpo en las que se han eliminado los epítomos de linfocitos T o secuencias que pueden unirse a moléculas de MHC de clase II o estimular linfocitos T o unirse a linfocitos T en asociación con moléculas de MHC de clase II.

En una realización adicional de la presente invención, la proteína bouganina modificada puede unirse con una proteína no anticuerpo incluso una proteína capaz de dirigir una interacción de unión específica con una célula diana particular. Dichos restos de proteína incluyen una diversidad de ligandos polipeptídicos para los cuales existen receptores de superficie celular específicos e incluyen por lo tanto numerosas citocinas, hormonas peptídicas y polipéptidos y otros modificadores de la respuesta biológica. Ejemplos destacables incluyen proteínas tales como factor de crecimiento epitelial vascular, factor de crecimiento epidérmico, herregulina, interleucinas, interferones, factor de necrosis tumoral y otras proteínas y moléculas de glucoproteína. Las proteínas de fusión de estas y otras moléculas con la bouganina de la presente invención pueden contemplarse y pueden comprender el resto de bouganina modificado en orientación del extremo N o extremo C con respecto al dominio ligando de la proteína. Del mismo modo, el entrecruzamiento químico del ligando purificado con la proteína bouganina modificada puede contemplarse y se encuentra dentro del ámbito de la presente invención.

En una realización adicional la proteína bouganina modificada de la presente invención puede usarse como un complejo que contiene un polímero hidrosoluble tal como hidroxipropilmetacrilamida u otros polímeros en los que la proteína bouganina modificada está en unión covalente con el polímero o en una interacción de unión no covalente con el polímero. Dicha realización puede incluir adicionalmente un dominio de unión a antígeno tal como un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo en combinación con el complejo de bouganina polimérico.

(C) Usos de las citotoxinas

- Las proteínas bouganinas modificadas de la invención pueden usarse para inhibir específicamente o destruir células de mamífero afectadas por cáncer. Es una ventaja de la citotoxinas de la invención que son menos inmunogénicas lo que permite que la RIP entre en la célula y destruya eficazmente células cancerosas. Por tanto, la citotoxina puede usarse para dirigir específicamente células cancerosas. La bouganina, una vez en la célula cancerosa, depura el ARN ribosómico principal, dañando por lo tanto los ribosomas y conduciendo al cese de la síntesis de proteínas y la muerte celular.
- Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona un procedimiento para inhibir o destruir una célula cancerosa que comprende administrar una citotoxina de la invención a un animal que lo necesite. La presente invención también incluye un uso de una citotoxina de la invención para inhibir o destruir una célula cancerosa. La presente invención incluye adicionalmente un uso de la citotoxina de la invención en la preparación de un medicamento para inhibir o destruir una célula cancerosa. El tipo de células cancerosas que se inhiben o destruyen por una citotoxina se determinará por la especificidad de antígeno de su parte de anticuerpo.
- En una realización, la invención proporciona un procedimiento para inhibir o destruir células cancerosas que comprenden las etapas de preparar una citotoxina de la invención y administrar la citotoxina a las células. El cáncer puede ser cualquier tipo de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer hepático, cáncer renal, melanomas, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer pulmonar microcítico y no microcítico, sarcomas, gliomas, linfomas de linfocitos T y B.
- La capacidad de las citotoxinas de la invención para inhibir selectivamente o destruir células cancerosas animales puede ensayarse fácilmente *in vitro* usando líneas celulares de cáncer de animales. El efecto inhibitor selectivo de las citotoxinas de la invención puede determinarse, por ejemplo, demostrando la inhibición selectiva de proliferación celular en las células cancerosas.
- La toxicidad puede medirse basándose en la viabilidad celular, por ejemplo la viabilidad de cultivos celulares normales y cancerosos expuestos a las citotoxinas puede compararse. La viabilidad puede evaluarse mediante técnicas conocidas tales como ensayos de exclusión con azul tripano.
- En otro ejemplo, pueden usarse diversos modelos para ensayar la citotoxicidad de las citotoxinas. Thompson, E. W. y col. (Breast Cancer Res. Treatment 31: 357-370 (1994)) han descrito un modelo para la determinación de invasividad de células cancerosas de mama humanas *in vitro* midiendo la proteólisis mediada por células tumorales de la matriz extracelular y la invasión de células tumorales de la membrana basal reconstruida (colágeno, laminina, fibronectina, Matrigel o gelatina). Otros modelos de células cancerosas aplicables incluyen células de adenocarcinoma de ovario cultivadas (Young, T. N. y col. Gynecol. Oncol. 62: 89-99 (1996); Moore, D. H. y col. Gynecol. Oncol. 65: 78-82 (1997)), células de cáncer tiroideo folicular humano (Demeure, M. J. y col., World J. Surg. 16: 770-776 (1992)), línea celulares de melanoma humano (A-2058) y fibrosarcoma (HT-1080) (Mackay, A. R. y col. Lab. Invest - 70: 781-783 (1994)), y líneas celulares escamosas de pulmón (HS-24) y adenocarcinoma (SB-3) (Spiess, E. y col. J. Histochem. Cytochem. 42: 917-929 (1994)). También se ha descrito un sistema de ensayo *in vivo* que implica la implantación de tumores y medición del crecimiento tumoral y metástasis en ratones desnudos atímicos (Thompson, E. W. y col., Breast Cancer Res. Treatment 31: 357-370 (1994); Shi, Y. E. y col., Cancer Res. 53: 1409-1415 (1993)).
- La presente invención también se refiere a un procedimiento para el tratamiento del cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz de una o más citotoxinas de la presente invención a un animal que lo necesite. La invención incluye un uso de una citotoxina de la invención para tratar el cáncer. Adicionalmente la invención incluye un uso de una citotoxina de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
- El término "animal" incluye todos los miembros del reino animal incluyendo seres humanos.
- La expresión "tratamiento del cáncer" o "tratar cáncer" se refiere a la inhibición de la replicación de células cancerosas, inhibición de dispersión de cáncer (metástasis), inhibición de crecimiento tumoral, reducción del número de células cancerosas o crecimiento tumoral, disminución del grado de malignidad de un cáncer o mejora de síntomas relacionados con cáncer.
- En una realización preferida, el animal es un ser humano. En otra realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer hepático, cáncer renal, melanomas, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer pulmonar microcítico y no microcítico, sarcomas, gliomas y linfomas de linfocitos T y B.
- Los resultados clínicos de los tratamientos contra el cáncer usando una citotoxina de la invención son fácilmente reconocibles por un experto en la técnica relevante, tal como un médico. Por ejemplo, los ensayos médicos convencionales para medir marcadores clínicos de cáncer pueden ser indicadores fuertes de la eficacia del tratamiento. Dichos ensayos pueden incluir, sin limitación, examen físico, escalas de rendimiento, marcadores de enfermedades, ECG de 12 cables, mediciones tumorales, biopsia tisular, citoscopia, citología, mayor diámetro de

- 5 cálculos de tumor, radiografía, formación digital de imágenes de tumores, signos vitales, peso, recuerdo de acontecimientos adversos, valoración de episodios infecciosos, valoración de medicaciones simultáneas, valoración del dolor, química de suero o sangre, análisis de orina, exploración CT, y análisis farmacocinético. Además, pueden determinarse efectos sinérgicos de una terapia de combinación que comprende la citotóxina y otra terapia contra el cáncer mediante estudios comparativos con pacientes que se someten a monoterapia.
- La remisión de tumores malignos puede evaluarse usando criterios aceptados por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo Therasse y col., 2000, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," J Natl Cancer Inst. 2 Feb; 92(3): 205-16.
- 10 La dosis eficaz de una construcción de citotóxina específica puede depender de diversos factores incluyendo el tipo de cáncer, el tamaño del tumor, la fase del cáncer, la toxicidad de la citotóxina contra el paciente, la especificidad del direccionamiento a las células cancerosas así como la edad, el peso y la salud del paciente.
- Las citotoxinas que comprenden la bouganina modificada pueden administrarse mediante infusión i.v. durante un periodo de minutos a horas, dependiendo de la dosis y de la concentración de la citotóxina en la infusión.
- 15 En una realización, la citotóxina se infunde durante un periodo de 3 horas.
- En una realización, la dosis eficaz mediante administración i.v. de la citotóxina puede variar de aproximadamente 1 a 100 mg/kg/dosis. En otras realizaciones, la dosis puede variar de aproximadamente 2 a 50 mg/kg/dosis. En realizaciones específicas, la dosis puede ser al menos aproximadamente de 2, 4, 8, 13, 20, 28, 40, 50 mg/kg/dosis.
- 20 En una realización, la dosis individual se administra aproximadamente cada semana durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas. La dosis individual puede administrarse en semanas consecutivas o, como alternativa, pueden saltarse una o más semanas. Después de este ciclo, un ciclo posterior puede comenzar aproximadamente 1, 2, 4, 6 o 12 semanas después. El régimen de tratamiento puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más ciclos, separándose cada ciclo aproximadamente 1, 2, 4, 6 o 12 semanas.
- 25 En otra realización la dosis individual se administra cada mes durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5 o 6 meses consecutivos. Después de este ciclo, un ciclo consecutivo puede comenzar aproximadamente 1, 2, 4, 6 o 12 meses después. El régimen de tratamiento puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más ciclos, separándose cada ciclo aproximadamente 1, 2, 4, 6 o 12 meses.
- 30 En una realización no limitante particular, la dosis eficaz de la citotóxina es entre aproximadamente 1 y 50 mg/kg/tumor/día, en la que al paciente se le administra una dosis individual al día. La dosis individual se administra aproximadamente cada día (de uno o más días pueden opcionalmente saltarse) durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días consecutivos. Después de este ciclo, puede comenzar un ciclo posterior aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o 6 semanas después. El régimen de tratamiento puede incluir 1, 2, 3, 4, 5, o 6 o más ciclos, separándose cada ciclo 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas.
- 35 El volumen de inyección preferentemente es al menos una cantidad eficaz, que es apropiada con el tipo y/o localización del tumor. El volumen de inyección máximo en una sola dosis puede estar entre aproximadamente el 25 % y el 75 % del volumen tumoral, por ejemplo aproximadamente un cuarto, un tercio o tres cuartos del volumen tumoral diana calculado. En una realización específica no limitante, el volumen de inyección máximo en una dosis individual es de aproximadamente el 30 % del volumen tumoral.
- 40 En otra realización, la citotóxina se infunde durante 3 horas a una tasa de 100 cm³ por hora con una solución que contiene de 1 a 10 mg de citotóxina/ml. La citotóxina se diluirá en una solución fisiológicamente compatible adecuada.
- 45 La dosis eficaz de otra terapia contra el cáncer a administrar junto con una citotóxina durante un ciclo también varía de acuerdo con el modo de administración. La una o más terapias contra el cáncer pueden administrarse por vía intratumoral o mediante otros modos de administración. Normalmente, los agentes quimioterapéuticos se administran sistémicamente. En la técnica se conocen dosificaciones y regímenes de tratamiento convencionales (véase, por ejemplo, las últimas ediciones del Merck Index y el Physician's Desk Reference; NCCN Practice Guidelines in Oncology)).
- 50 La terapia de combinación con una citotóxina puede sensibilizar el cáncer o el tumor para la administración de una terapia de cáncer adicional. Por consiguiente, la presente invención contempla terapias de combinación para prevenir, tratar y/o prevenir la recurrencia de cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz de una citotóxina antes, después o simultáneamente con una dosis reducida de un agente terapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, el tratamiento inicial con una citotóxina puede aumentar la sensibilidad de un cáncer o tumor contra una exposición posterior con una dosis de agente terapéutico contra el cáncer. Esta dosis es próxima a, o por debajo de, el intervalo inferior de dosificaciones convencionales cuando el agente terapéutico contra el cáncer se administra en solitario o en ausencia de una citotóxina. Cuando se administra simultáneamente, la citotóxina puede administrarse separada de la terapia contra el cáncer y opcionalmente mediante un modo de administración diferente.
- 55

En otra realización, se administra una citotoxina en combinación con al menos otro agente inmunoterapéutico.

5 En otra realización, se administra una citotoxina en combinación con un régimen de radioterapia. La terapia también puede comprender cirugía y/o quimioterapia. Por ejemplo, la citotoxina puede administrarse en combinación con radioterapia y cisplatino (Platinol), fluorouracilo (5-FU, Aducril), carboplatino (Paraplatino) y paclitaxel (Taxol). El tratamiento con la citotoxina permite el uso de dosis inferiores de radiación y/o tratamiento de radiación menos frecuentes, que pueden por ejemplo reducir la frecuencia de angina grave que impide la función de deglución posiblemente dando como resultado una pérdida de peso o deshidratación no deseadas.

10 En otra realización, se administra una citotoxina en combinación con una o más citocinas que incluyen, sin limitación, una linfocina, factores de necrosis tumoral, citocina similar al factor de necrosis tumoral, linfotóxina, interferón, proteína inflamatoria de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos/monocitos, interleucina (incluyendo sin limitación, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6, interleucina-12, interleucina-15, interleucina-18), y sus variantes, incluyendo una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas.

15 En otra realización adicional, se administra una citotoxina en combinación con una vacuna contra el cáncer que incluye, sin limitación, células o tejidos autólogos, células o tejidos no autólogos, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica humana, vacuna viva BCG, proteínas de linaje melanocítico y antígenos específicos mutados tumorales.

20 En otra realización adicional, se administra una citotoxina en asociación con terapia hormonal. Los agentes terapéuticos hormonales incluyen sin limitación, un agonista hormonal, un antagonista hormonal (por ejemplo, flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolide (LUPRON)) y esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, testosterona, progestina).

En otra realización adicional, se administra una citotoxina en asociación con un programa de terapia génica para tratar o prevenir el cáncer.

25 En otra realización adicional, se administra una citotoxina dirigida a Ep-CAM en combinación con uno o más agentes que aumentan la expresión de Ep-CAM en las células tumorales de interés. Preferentemente la expresión de Ep-CAM aumenta de tal manera que un mayor número de moléculas Ep-CAM se expresen sobre la superficie de las células tumorales. Por ejemplo, el agente puede inhibir los ciclos normales de endocitosis de antígeno Ep-CAM. Dicho tratamiento de combinación puede mejorar la eficacia clínica de la citotoxina dirigida a Ep-CAM en solitario, o con otras terapias cancerosas o radioterapia. En realizaciones no limitantes específicas, el agente que aumenta la expresión de Ep-CAM en las células tumorales es el tartrato de vinorelbina (Navelbine) y/o paclitax (Taxol). Véase, por ejemplo Thurmond y col., 2003, "Adenocarcinoma cells exposed in vitro to Navelbine or Taxol increase Ep-CAM expression through a novel mechanism." *Cancer Immunol Immunother.* Jul; 52(7): 429-37.

30

35 La terapia de combinación puede por tanto aumentar la sensibilidad del cáncer o tumor para administrar la citotoxina y/o agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales. De esta manera, pueden ser posibles ciclos de tratamiento más cortos reduciendo por lo tanto los acontecimientos tóxicos. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir cáncer que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de una citotoxina y al menos otro agente terapéutico contra el cáncer durante un ciclo de tratamiento corto. La duración del ciclo puede variar de acuerdo con el agente terapéutico contra el cáncer específico que se use. La invención también contempla administración continua o discontinua, o dosis diarias divididas en diversas administraciones parciales. Una duración de ciclo apropiada de un agente terapéutico contra el cáncer específico se apreciará por los expertos en la técnica y la invención contempla la valoración continuada de programas de tratamiento óptimos para cada agente terapéutico contra el cáncer. En la técnica se conocen guías específicas para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo Therasse y col., 2000, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada," *J Natl Cancer Inst.* 2 Feb; 92(3): 205-16.

40

45

Como alternativa, pueden desearse ciclos de tratamiento más largos. Por consiguiente, la duración del ciclo puede variar de aproximadamente 10 a 56, de 12 a 48, de 14 a 28, de 16 a 24 o de 18 a 20 días. La duración del ciclo puede variar de acuerdo con el agente terapéutico contra el cáncer específico en uso.

50 La presente invención contempla al menos un ciclo, preferentemente más de un ciclo durante el cual se administra un solo agente terapéutico contra el cáncer o series de agentes terapéuticos. Un número total de ciclos apropiado y el intervalo entre los ciclos se apreciarán por un experto en la materia. El número de ciclos puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 ciclos. El intervalo entre ciclos puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 días. La invención contempla la evaluación continua de regímenes de tratamiento óptimos para cada citotoxina y agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales.

55 En otra realización, se proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de un mamífero con cáncer que comprende las etapas de identificar epítomos de linfocitos T de bouganina que tienen una propensión reducida por linfocitos T activados; preparar una citotoxina de la invención que tenga uno o más de los epítomos de linfocitos T y suspender la proteína en un vehículo, diluyente o excipiente

farmacéuticamente aceptables.

La invención también proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de un mamífero con cáncer que comprende una citotoxina de la invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

5 Las citotoxinas de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas para la administración a sujetos de una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*. Por "forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*" se entiende una forma de la sustancia a administrar en la que se sobrepasa cualquiera de los efectos tóxicos por los efectos terapéuticos. Las sustancias pueden administrarse a organismos vivos incluyendo seres humanos y animales. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se define como una cantidad eficaz a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado: por ejemplo una cantidad terapéuticamente activa de una sustancia puede variar de acuerdo con factores tales como patología, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo para suscitar una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse diversas dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indica mediante las exigencias de la situación terapéutica.

15 La sustancia activa puede administrarse de una manera conveniente tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc.), administración oral, inhalación, administración transdérmica (tal como una crema tópica o pomada, etc.) o aplicaciones de supositorio. Dependiendo de la vía de administración, la sustancia activa puede revestirse de un material para proteger el compuesto de la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

20 Las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse por procedimientos en sí mismos conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos tal como una cantidad eficaz de la sustancia activa combinada en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente adecuado. Se describen vehículos adecuados, por ejemplo, en Remington Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., Estados Unidos 1985). Basándose en esto, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de las sustancias en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables y contenidos en soluciones tampón con un pH adecuado e isoosmótico con los fluidos fisiológicos.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden usarse en procedimientos para tratar animales incluyendo mamíferos, preferentemente seres humanos con cáncer. Se prevé que las composiciones sean particularmente útiles para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer pulmonar microcítico y no microcítico, sarcomas, gliomas, linfomas de linfocitos T y B. La dosificación y tipo de citotoxina a administrar dependerá de diversos factores que pueden fácilmente controlarse en sujetos humanos. Dichos factores incluyen la etiología y gravedad (grado y fase) de neoplasia.

30 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración directa incluyen sin limitación polvos liofilizados o soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que adicionalmente pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente isotónicas con la sangre del receptor deseado. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones incluyen agua, alcoholes, polioles, glicerinas y aceites vegetales, por ejemplo. Pueden prepararse soluciones o suspensiones de inyección improvisada a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos. Las citotoxinas pueden proporcionarse, por ejemplo, pero sin ningún tipo de limitación, como un polvo liofilizado que se reconstituye con agua estéril o solución salina antes de la administración al paciente.

35 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen composiciones esencialmente químicamente inertes y no tóxicas que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Como ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas, soluciones de glicerol, etanol, cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfotidil-etanolamina (DOPE) y liposomas. Dichas composiciones deben contener una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración directa al paciente.

40 En otra realización, una composición farmacéutica comprende una fitotoxina y uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 La composición puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, aquellas formas con grupos amino libres tales como los derivados de ácido clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y aquellos formados con grupos carboxilo libres tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

55 En la medida en que la presente invención se refiere a bouganina modificada, composiciones que contienen dichas proteínas bouganinas modificadas o fragmentos de proteínas bouganinas modificadas y composiciones relacionadas

deberían considerarse dentro del ámbito de la invención. Un ejemplo pertinente en cuanto a esto debe ser el desarrollo de estrategias de inducción a la tolerancia mediadas por péptidos en las que uno o más de los péptidos desvelados se administran a un paciente con una intención inmunoterapéutica. Por consiguiente, moléculas peptídicas sintéticas, por ejemplo una o más de las que comprenden toda o parte de cualquiera de las regiones epitópicas R1 – R3 como se ha definido anteriormente. Dichos péptidos se consideran realizaciones de la invención.

En un aspecto adicional de la presente invención se refiere a procedimientos para el tratamiento terapéutico de seres humanos usando las composiciones de bouganina modificada. Para la administración a un individuo, debe producirse cualquiera de las composiciones modificadas preferentemente al menos con una pureza del 80 % y sin pirógenos y otros contaminantes.

La presente invención también proporciona un kit que comprende una cantidad eficaz de una citotoxina, opcionalmente en combinación con uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer junto con instrucciones para el uso de los mismos para el tratamiento del cáncer.

(D) Péptidos de epítomos de linfocitos T

Una realización adicional de la invención es un péptido del epítomo de linfocitos T. En un ejemplo, el péptido de epítomo de linfocitos T es capaz de suscitar un índice de estimulación mayor de 1,8 en un ensayo con linfocitos T, más preferentemente mayor de 2,0. El péptido de epítomo de linfocitos T de la invención puede unirse al MCH de clase II.

En una realización de la invención el péptido del epítomo de linfocito T comprende al menos 9 restos de aminoácidos consecutivos de cualquiera de las secuencias de R1, R2 o R3 (anteriores). En otra realización, la secuencia peptídica del epítomo de linfocito T tiene una identidad de aminoácidos mayor del 90 % con una cualquiera de las secuencias peptídicas R1, R2 o R3; más preferentemente, el péptido del epítomo de linfocitos T tiene una identidad de aminoácidos mayor del 80 % con cualquiera de las secuencias peptídicas R1, R2 o R3.

El término “péptido” como se usa en el presente documento es un compuesto que incluye dos o más aminoácidos. Los aminoácidos están unidos entre sí por un enlace peptídico (definido en el presente documento más adelante). Existen 20 aminoácidos de origen natural diferentes implicados en la producción biológica de péptidos, y cualquier cantidad de ellos puede unirse en cualquier orden para formar una cadena o un anillo peptídico. Los aminoácidos de origen natural empleados en la producción biológica de péptidos tienen todos la configuración L. Los péptidos sintéticos pueden prepararse empleando procedimientos sintéticos convencionales, utilizando L aminoácidos, D aminoácidos o diversas combinaciones de aminoácidos de las dos diferentes configuraciones. Algunos péptidos solo contienen algunas unidades de aminoácidos. Los péptidos cortos, por ejemplo los que tienen menos de diez unidades de aminoácidos, se denominan algunas veces “oligopéptidos”. Otros péptidos contienen una gran cantidad de restos de aminoácidos, por ejemplo hasta 100 o más, y se denominan “polipéptidos”. Por convención, un “polipéptido” puede considerarse como cualquier cadena peptídica que contenga tres o más aminoácidos, mientras que un “oligopéptido” normalmente se considera como un tipo particular de polipéptido “corto”. Por tanto, como se usa en el presente documento, se entiende que cualquier referencia a un “polipéptido” también incluye un oligopéptido. Además, cualquier referencia a un “péptido” incluye polipéptidos, oligopéptidos y proteínas. Cada disposición diferente de aminoácidos forma diferentes polipéptidos o proteínas. El número de polipéptidos y por lo tanto el número de diferentes proteínas que pueden formarse es prácticamente ilimitado.

Otra realización de la invención es el uso de péptidos de epítomos de linfocitos T de la invención para preparar las proteínas bouganina modificadas de la invención y péptidos de epítomos de linfocitos T modificados.

Una realización adicional de la invención es un péptido de epítomos de linfocitos T modificado tal como el péptido de epítomos de linfocitos T modificado que tiene una propensión reducida para activar linfocitos T humanos en comparación con el péptido de epítomo de linfocito T no modificado. En un ejemplo, los péptidos de epítomo de linfocitos T modificados de la invención contienen modificaciones de tal manera que cuando se someten a ensayo en un ensayo de linfocitos T suscitan un índice de estimulación reducido en comparación con el péptido del epítomo de linfocitos T no modificado.

En una realización de la invención el péptido del epítomo de linfocito T modificado tiene la siguiente secuencia:
AKX¹ DRKX² LX³ LGVX⁴ KL

en la que al menos uno de X¹, X², X³ y X⁴ se modifica de la secuencia no modificada, de la siguiente manera:

X¹ es T o A o Q;
X² es G o A;
X³ es Q o G; y
X⁴ es N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S (SEC ID N°: 8).

En otra realización de la invención el péptido del epítomo de linfocito T modificado tiene la siguiente secuencia:
LGVX⁴ KLEFSIEAIHG

en la que X⁴ es N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S (SEC ID N°: 9).

En una realización adicional de la invención el péptido de epítomo de linfocito T modificado tiene la siguiente

secuencia:

NGQEX⁵AKFFLIVIQM

en la que X⁵ es Q o A (SEC ID N°: 10).

5 La invención también proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican los péptidos de epítipo de linfocito T o péptidos de epítipo de linfocitos T modificados de la invención.

Las siguientes figuras, listados de secuencias y ejemplos se proporcionan para ayudar a comprender la presente invención.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención.

Ejemplos

10 **Ejemplo 1: Procedimiento para el mapeo de epítipos en bouganina usando ensayos de proliferación de linfocitos T humanos sin tratar**

Se sintetizaron péptidos que incluyen la secuencia de la proteína bouganina madura, como describen Den Hartog y col [mencionado anteriormente]. La longitud de cada péptido es de 15 aminoácidos y sucesivos péptidos se solapan en 12 restos. La secuencia de estos péptidos y su numeración se indican en la TABLA 1.

15 Los péptidos se usaron en ensayos de proliferación de linfocitos T con PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sin tratar (es decir sin sensibilización conocida a bouganina). Se seleccionaron 20 PBMC donantes para conseguir una cobertura óptima de todos los alotipos de MHC de clase II. La cobertura alotípica es un exceso del 85 %. Los alotipos HLA-DR se muestran en la TABLA 2.

20 Las PBMC se estimularon con péptidos individuales en cultivos por triplicado durante 7 días antes de evaluar la proliferación mediante incorporación de ³H-timidina (³H-Thy). Todos los péptidos se sometieron a ensayo a dos concentraciones diferentes (1 μ M y 5 μ M). Los índices de estimulación (I.E.) se calcularon como la cantidad de ³H incorporada, dividido entre la cantidad de ³H incorporada en células control estimuladas de modo simulado.

25 Se obtuvieron capas leucocíticas de sangre humana conservada durante menos de 12 horas del National Blood Service (Addenbrooks Hospital, Cambridge, RU). El Ficoll-paquete se obtuvo de Amersham Pharmacia Biotech (Amersham, RU). Los medios AIM V asépticos para el cultivo de linfocitos humanos primarios y que contenían L-glutamina, estreptomina 50 μ g/ml, gentamicina 10 μ g/ml y albúmina de suero humano al 0,1 % procedían de Gibco-BRL (Paisley, RU). Los péptidos sintéticos se obtuvieron de Eurosequence (Groningen, Países Bajos) y Babraham Technix (Cambridge, RU).

30 Los eritrocitos y leucocitos se separaron del plasma y las plaquetas centrifugando suavemente las capas leucocíticas. La fase superior (que contenía el plasma y las plaquetas) se retiró y se desechó. Los eritrocitos y leucocitos se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato 1:1 (PBS) antes de estratificarse sobre una ficoll-paquete de 15 ml (Amersham Pharmacia, Amersham RU). La centrifugación se realizó de acuerdo con las condiciones recomendadas por los fabricantes y las PBMC se recogieron de la interfaz de suero+PBS/ficoll paquete. Las PBMC se mezclaron con PBS (1:1) y se recogieron por centrifugación. El sobrenadante se retiró y se descartó y el sedimento de PBMC se resuspendió en PBS a 50 ml. Las células se sedimentaron de nuevo por centrifugación y se descartó el sobrenadante de PBS. Las células se resuspendieron usando 50ml de medio AIM V y en este momento se realizó el recuento y la viabilidad se evaluó usando una exclusión de colorante de azul tripano. De nuevo las células se recogieron por centrifugación y el sobrenadante se desechó. Las células se resuspendieron para la conservación criogénica a una densidad de 3×10^7 por ml. El medio de conservación fue suero humano AB termoinactivado 90 % v/v (Sigma, Poole, RU) y DMSO al 10 % (v/v) (Sigma, Poole, RU). Las células se transfirieron a un envase de congelación regulado (Sigma) y se colocó a -70 °C durante una noche. Cuando se requirieron para su uso, las células se descongelaron rápidamente en un baño con agua a 37 °C antes de transferir al medio AIM V precalentado de 10 ml.

45 Las PBMC se estimularon con antígenos de proteína y péptidos en una placa de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de 2×10^5 PBMC por pocillo. Las PBMC se incubaron durante 7 días a 37 °C antes de pulsar con ³H-Thy (Amersham-Pharmacia, Amersham, RU). Dos péptidos de control denominados C-32 y C-49 que previamente habían demostrado que eran inmunogénicos y una potente proteína completa de Hemocianina de Lapa Californiana (KLH) de antígeno sin recuerdo se usó en cada ensayo del donante. C-32 = secuencia PKYVKQNTLKLAT de restos de hemaglutinina gripal 307-319 (SEC ID N°: 127). C-49 = secuencia KVDQIKKISKPVQH de Clamidia HSP 60 (SEC ID N°: 128).

50 Los péptidos se disolvieron en DMSO a una concentración final de 10 mM. Estas soluciones madre se diluyeron después a 1/500 en medios AIM V (concentración final 20 μ M). Los péptidos se añadieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano para proporcionar una concentración final de 1 y 5 μ M en 100 μ l. La viabilidad de las PBMC descongeladas se evaluó mediante exclusión con colorante azul tripano, después las células se resuspendieron a una densidad de 2×10^6 células/ml, y se transfirieron 100 μ l (2×10^5 PBMC/pocillo) a cada pocillo que contenía los péptidos. Se ensayaron cultivos de los pocillos por triplicado a cada concentración peptídica. Las placas se incubaron durante 7 días en una atmósfera húmeda de CO₂ al 5 % a 37 °C. Las células se impulsaron durante 18-21

horas con 1 μCi ^3H -Thy/pocillo antes de recoger sobre alfombrillas de filtro. Se determinaron los valores de CPM usando un contador de placa beta top de Wallac microplate (Perkin Elmer). Los resultados se expresaron como índices de estimulación, derivados de la división de la puntuación de proliferación (por ejemplo recuentos por minuto de radiactividad) medido en el péptido de ensayo por la puntuación medida en células no puestas en contacto con un péptido de ensayo.

El resumen de los resultados del ensayo anterior indica la presencia de cuatro epítomos de linfocitos T, correspondientes a los péptidos 41, 44 y 50 en la región procesada madura de la proteína y el péptido 88 en la forma no procesada. Dado que el epítomo en el péptido 88 no forma parte de la proteína madura, este se ignora en el esquema de la presente invención.

Para el péptido 41 (denominado región epitópica R1), hay cuatro donantes sensibles a este péptido, los donantes 4, 5, 10 y 11. Los I.E. para estos a 5 μM son 3,6, 4,9, 2,1 y 2,0 respectivamente.

Para el péptido 44 (denominado región epitópica R2). Existen dos donantes sensibles a este péptido; los donantes 4 (I.E. = 3,5) y 11 (I.E. = 2,3). Los péptidos 43 y 45 colindantes indujeron un menor nivel de proliferación de linfocitos T dado que ambos péptidos se solapan en 12 aminoácidos con el péptido 44.

Para el péptido 50 hubo 2 donantes sensibles a este péptido; los donantes 4 (I.E. = 2,9) y 14 (I.E. = 2,0). El péptido 51 indujo un menor nivel de proliferación de linfocitos T en el donante 14 (I.E. > 1,9).

Los tipos tisulares para todas las muestras PBMC se ensayaron usando un sistema de reactivo disponible en el mercado (Dynal, Wirral, RU). Los ensayos se realizaron de acuerdo con los protocolos recomendados por el proveedor y reactivos auxiliares convencionales y sistema de electroforesis con agarosa. En la TABLA 2 se muestran las especificidades alotípicas de cada una de las muestras de los donantes sensibles.

Ejemplo 2: Clonación de la bouganina procedente de *Bougainvillea spectabilis*

Se extrajo ARN total de las hojas de *Bougainvillea spectabilis* usando el sistema de aislamiento de ARN Total SV y protocolos proporcionados por el fabricante (Promega, Southampton, RU). Tejido foliar reciente se molió hasta convertirlo en un polvo fino con nitrógeno líquido y se usaron aproximadamente 50 mg de tejido molido para el aislamiento de ARN. La calidad y cantidad de ARN se comprobó visualizando sobre un gel de agarosa al 1 % y el gen de bouganina se amplificó a partir del ARN total usando el sistema 'Access RT-PCR System' (Promega) usando aproximadamente 1 μg de ARN por reacción y con los cebadores específicos de genes OL1032 y OL1033. Las secuencias de los cebadores se proporcionan en la siguiente TABLA 3. Esta reacción generó un fragmento de 1242 pb que incluyen la secuencia líder nativa y la secuencia de bouganina de longitud completa. Este fragmento se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega), siguiendo las instrucciones del kit y se denominó pBou1. La secuencia se confirmó por secuenciación de ADN.

El gen de bouganina se transfirió al pET21a (Novagen, Nottingham, RU) por clonación con PCR usando como molde el plásmido pBou1. Se añadió la secuencia líder A pelB (pectato liasa) al extremo 5', y se añadió una secuencia que codifica una etiqueta de 6 histidinas en el extremo 3' de la secuencia codificante de la bouganina. La secuencia líder pelB se amplificó a partir del vector pPMI-his [Molloy, P. y col, (1995) J. Applied Bacteriology, 78: 359-365] usando el cebador OL1322 (que incorpora un sitio Nde1) y el cebador OL1067. El fragmento de bouganina-his se amplificó de pBou1 usando OL1068 y OL1323 (que incorpora un sitio Not1). La secuencia líder pelB se fusionó en fase con el fragmento de bouganina-his usando PCR solapante y el fragmento resultante se clonó en pGEM-T Easy (Promega). La confirmación de la secuencia posterior del fragmento pelB-bouganina-his se clonó como un fragmento Nde1-Not1 en pET21a digerido con Nde1-Not1. Este clon se denominó pBou32.

Ejemplo 3: Construcción de proteínas bouganina mutantes

Se diseñaron diversas proteínas bouganina modificadas (mutantes) usando los datos proporcionados por el procedimiento del mapeo de epítomo de linfocitos T y se usó un programa informático que podía simular la unión de péptidos con el surco de unión a MHC de clase II humano. Esta última estrategia se describe con detalle en otro sitio [documento WO 02/069232]. Se construyeron genes variantes y las proteínas mutantes se ensayaron con respecto a la actividad funcional. En general, las proteínas "de un solo mutante" que contienen cada una una sustitución de aminoácidos se construyeron en primer lugar y se ensayaron, después los genes de proteínas modificadas activas se combinaron para producir proteínas modificadas múltiples sustituidas.

Se construyeron genes mutantes usando un procedimiento de PCR solapante en el que el codón de aminoácido mutante se introdujo en el gen mediante el uso de un mutante en "cebador de solapamiento". El esquema es bien conocido en la técnica y se describe con detalla en otro sitio [Higuchi, y col (1990) Nucl. Acids Res. 16: 7351]. Un total de 37 proteínas modificadas de un solo mutante se construyeron y se ensayaron con respecto a la actividad funcional conservada. Además, en todos los análisis también se construyó y se ensayó una proteína modificada como control negativo que contenía una sustitución Y70A. Una de las 37 proteínas modificadas "de un solo mutante" de hecho contenía dos sustituciones directamente adyacentes (E151T e I152E) y se contaron en el presente documento como un solo mutante. Las sustituciones ensayadas y los valores de actividad correspondientes se proporcionan en la TABLA 4.

Se construyó un total de 11 proteínas modificadas de múltiple sustitución y se ensayaron con respecto a la actividad conservada. Las sustituciones ensayadas y los valores de actividad correspondientes se proporcionan en la TABLA 5.

La TABLA 6 describe las secuencias de las proteínas modificadas por sustitución. La TABLA 7 enumera algunas secuencias específicas.

- 5 En todos los casos, las proteínas se purificaron y ensayaron de acuerdo con los procedimientos indicados en los ejemplos 4 y 5 más adelante.

Ejemplo 4: Expresión y purificación de la proteína bouganina

10 El plásmido pBou32 se transformó en líneas competentes BL21(DE3) (Novagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se seleccionó en placas LB (Invitrogen, Paisley, RU) que contenían carbenicilina 50 µg/ml. Para inocular 50 ml de caldo 2xYT (Invitrogen) se usó una colonia reciente de esta transformación, sin antibiótico, y esto se cultivó con agitación de 250 rpm a 37 °C hasta alcanzar una DO600 = 1,5-2,0. Después el cultivo se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, y las células se resuspendieron en 5 ml de IPTG 1 mM más 2xYT reciente. Este cultivo se incubó a 30 °C en agitación a 300 rpm durante 1,5 horas y las células se recogieron por centrifugación y el sobrenadante se desechó.

15 El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de PEB2 (Tris-HCl 50 mM pH8, sacarosa al 20 %, lisozima 1 mg/ml, 1x Comprimido de Inhibidor de Proteasa Completo (Roche, Lewes, RU) y se incubó en hielo durante 1 hora con suave agitación. El residuo celular se centrifugó a 14.000 rpm a 4 °C y el sedimento se desechó. El sobrenadante resultante se denominó ahora 'fracción periplásmica'. La proteína bouganina se purificó de la fracción periplásmica mediante cromatografía de columna con afinidad de níquel usando una "columna centrífuga" disponible en el mercado y siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen, Crawley, RU). El material resultante se dializó frente a 20 4 litros de solución salina tamponada con fosfato (NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M, pH 7,4) durante una noche a 4 °C usando un 'Slide-A-Lyzer' de límite de peso molecular 10.000 (Pierce, Chester, RU). Después de diálisis, la concentración de proteína se calculó usando el Kit de Ensayo Micro BCA (Pierce) y las muestras se conservaron a -20 °C.

25 La concentración de proteína bouganina se determinó adicionalmente usando un sistema de ensayo basado en ELISA. Brevemente, se generó antisuero contra bouganina (Genovac, Friburgo, Alemania) mediante la inmunización genética de dos ratas con un plásmido que expresaba bouganina. Para el ELISA, se capturó la bouganina recombinante en placas revestidas con Ni-agarosa mediante su etiqueta de histidina y posteriormente se detectó con el antisuero de rata y un anticuerpo anti Fc de rata conjugado con HRP secundario (Sigma, Poole, RU). Como un patrón, en cada determinación se usó una gran preparación de bouganina de tipo silvestre expresada en *E. coli* y se cuantificó usando el ensayo de proteína total.

Ejemplo 5: Ensayo de actividad de bouganina

La actividad de las proteínas bouganina de tipo silvestre y modificadas (mutantes) se ensayó midiendo su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas en un ensayo de síntesis de proteína acelular.

35 Una mezcla de 10 µl de mezcla de Transcripción/Traducción Acoplada a TNT (Promega), metionina 20 µM, 120 ng de ADN luciferasa de pT7 (Promega) y diluciones en serie de proteína bouganina de tipo silvestre mutante en un volumen final de 12,5 µl se incubaron a 30 °C durante una hora, después de lo cual la reacción se detuvo por la adición de 100 µl de reactivo de ensayo luciferasa 'SteadyGlow' (Promega). La actividad luciferasa se midió usando un contador de luminiscencia Wallac. La proteína bouganina activa se detectó como una disminución en la actividad luciferasa medida. Cada proteína bouganina modificada se sometió a ensayo al menos en 5 concentraciones, con cada punto de dato por duplicado. Los controles positivos y negativos se incluyeron en cada experimento.

45 En la TABLA 4 se muestran los resultados de proteínas mutantes sencillas. Los resultados de proteínas bouganina modificada mutantes múltiples se muestran en la TABLA 5. En cada caso los resultados se expresan con respecto a la actividad de la proteína de tipo silvestre. Todos los ensayos se realizaron con la inclusión de una proteína bouganina mutante inactiva con una sustitución Y70A.

Además, los resultados del ensayo luciferasa pueden representarse gráficamente mostrando el % de actividad luciferasa con respecto al control frente a la concentración de proteínas de la bouganina añadida. Ejemplos de dichas representaciones gráficas se muestran en la Figura 1 que representa los resultados determinados mediante dos proteínas bouganina mutantes múltiples diferentes.

50 **Ejemplo 6: Ensayo de secuencias de bouganina variante para la pérdida de epítopos de linfocitos T.**

La proteína modificada múltiple denominada Bou156 se seleccionó para ensayar adicionalmente usando un ensayo de inmunogenicidad. Esta variante contiene las sustituciones V123A, D127A, Y133N e I152A. El ensayo de inmunogenicidad implica el uso de células vivas que pueden resultar dañadas ensayando el uso de la proteína bouganina completa, por lo tanto esos ensayos se realizaron usando péptidos sintéticos que comprendían las sustituciones incorporadas en la variante Bou156. Los péptidos ensayados se indican en la TABLA 8. Los ensayos se

realizaron de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo 1 (anterior) usando un grupo de donantes PBMC de 20 individuos. Los péptidos se ensayaron por triplicado para cada muestra de donante a dos concentraciones peptídicas finales diferentes (1 μ M y 5 μ M).

5 Los resultados se expresan como IE por péptido por muestra donante y se muestran en la Figura 2. Del-41 es la secuencia peptídica AKADRKALELGVNKL (SEC ID N°: 29). Del-44 es la secuencia peptídica LGVNKLEFSIEAIHG (SEC ID N°: 30). Del-50 es la secuencia peptídica NGQEAAKFFLIVIQM (SEC ID N°: 31). Ninguno de los péptidos modificados indujeron una respuesta de linfocitos T en ninguno de los donantes (IE<2). En cambio, un péptido de control inmunogénico estimuló linfocitos T de 6 donantes (IE>2).

10 **Ejemplo 7:** VB6-845: modificación genética recombinante de un anticuerpo Fab específico de Ep-CAM para la administración óptima de bouganina des-inmunizada (De-bouganina).

Para este ejemplo y el Ejemplo 8, la bouganina des-inmunizada usada es Bou156.

15 Las citotoxinas que se dirigen a tumores se componen de la región variable de un anticuerpo unido a una toxina bacteriana, fúngica o vegetal. El presente estudio ilustra que las construcciones de bouganina desinmunizadas de la invención, que comprenden bouganina desinmunizada unida a un resto diana tienen inmunogenicidad reducida, aunque aún conservan su actividad biológica. La TABLA 12 demuestra la unión del anticuerpo Ep-CAM a diversos tipos de tumores y por tanto muestra que este puede usarse para tratar estos tipos de cánceres.

Construcción de bouganina desinmunizada: resto de direccionamiento dirigido a Ep-CAM unido a de-bouganina

20 VB5-845, una versión Fab de un anticuerpo scFv anti-Ep-CAM, se unió genéticamente a una forma desinmunizada de bouganina (de-bouganina), Bou 156, una fuerte proteína inactivadora de ribosomas (RIP) de tipo I derivada de plantas, para crear la construcción anticuerpo-toxina VB6-845. La Figura 3 ilustra la construcción VB6-845. La Figura 3A ilustra la unidad dicistrónica de la pro-VB6-845, con las secuencias líder pelB. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 16) y la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 15) se proporcionan en la Figura 3B. La Figura 3C ilustra la proteína VB6-845 ensamblada, que se describe más adelante con más detalle. El ensayo de esta construcción, ilustra que la construcción conserva su actividad biológica (citotoxicidad) y la especificidad del resto diana (anticuerpo Ep-CAM).

Orientación de la construcción de bouganina desinmunizada

Para determinar la orientación óptica del anticuerpo-de-bouganina, se generaron diversas formas de una unidad de expresión dicistrónica, se expresaron y se ensayaron con respecto a la fuerza.

30 En cada caso, la unida dicistrónica se clonó en el vector pING3302 (Figura 4) bajo el control del promotor *araBAD* inducible por arabinosa y transformado en *E. coli* E104. Después de la inducción, la presencia de la secuencia líder pelB dirigió la secreción de la proteína de fusión Fab-de-bouganina en el sobrenadante de cultivo. El engarce escindible permitió que la de-bouganina se escindiera desde el resto diana y ejerciera su actividad biológica. En una realización, el engarce es un engarce de furina, aunque un experto en la técnica apreciará que pueden ser adecuados otros engarces escindibles. Los engarces preferidos podrían seleccionarse basándose en su especificidad diana, y entorno. Un ejemplo de las construcciones fabricadas y ensayadas son las siguientes:

Figura 3: VB6-845, en el que la de-bouganina (Bou156) está unida al extremo C del dominio CH mediante un engarce de furina. La Figura 3A ilustra la unidad dicistrónica de las secuencias pro, la Figura 3B ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 15) y la secuencia de aminoácidos de las secuencias pro (SEC ID N°: 16) y la Figura 3C ilustra la proteína VB6-845 ensamblada sin las secuencias pelB.

40 La Figura 5 ilustra la construcción anti-Ep-CAM Fab de control sin la toxina vegetal, de-bouganina (VB5-845). La Figura 5A ilustra la unidad dicistrónica de las secuencias pro, la Figura 5B ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 17) y la secuencia de aminoácidos de las secuencias pro (SEC ID N°: 18) y la Figura 5C ilustra la proteína VB6-845 ensamblada sin las secuencia pelB.

45 La Figura 6 ilustra la construcción Fab anti-Ep-CAM de bouganina, VB6-845-C_L-de-bouganina, en la que la Bou156 está unida en el extremo C del dominio C_L. La Figura 6A ilustra la unidad dicistrónica de las secuencias pro, la Figura 6B ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 19) y la secuencia de aminoácidos de las secuencias pro (SEC ID N°: 20) y la Figura 6C ilustra la proteína VB6-845-C_L-de-bouganina ensamblada sin las secuencias pelB.

50 La Figura 7 ilustra la construcción Fab anti Ep-CAM, de-bouganina, VB6-845-NV_H-de-bouganina, en la que Bou156 está unido al extremo N del dominio V_H. La Figura 7A ilustra las unidades dicistrónicas de las secuencias pro, la Figura 7B ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 21) y la secuencia de aminoácidos de las secuencias pro (SEC ID N°: 22) y la Figura 7C ilustra la proteína VB6-845-NV_H-de-bouganina ensamblada sin las secuencias pelB.

La Figura 8 ilustra la construcción Fab anti-Ep-CAM VB6-845-NV_L-de-bouganina, en la que Bou156 está unida al extremo N del dominio V_L. La Figura 8A ilustra la unidad dicistrónica de las secuencias pro, la Figura 8B ilustra la

secuencia codificante de ácido nucleico (SEC ID N°: 23) y la secuencia de aminoácidos de las secuencias pro (SEC ID N°: 24) y la Figura 8C ilustra la proteína VB6-845-NV_L-de-bouganina ensamblada sin las secuencias peIB.

En una realización, la molécula de-bouganina está unida al extremo C terminal de las cadenas pesada o ligera. La configuración óptima comprendía una secuencia líder peIB adyacente al dominio V_H-C_H con una etiqueta de afinidad de histidina N terminal como la primera unidad. Inmediatamente después va la segunda unidad que comprende el dominio peIB-V_L-C_L unido a la de-bouganina por un engarce sensible a proteasa. (Figura 6) Para las construcciones en las que la de-bouganina se recolocó en el extremo N terminal, el análisis de transferencia de Western no mostró ningún producto detectable y solo la de-bouganina unida a extremo C (construcciones de las Figuras 3 y 6) produjo una proteína soluble intacta (Figura 9) con buenas propiedades de unión a las líneas celulares Ep-CAM positivas, como se ilustra en los ensayos de reactividad detectados por citometría de flujo. En el análisis de transferencia de Western, la Figura 9 ilustra la expresión de VB6-845 y VB6-845 CL-de-bouganina en el sobrenadante de células E104 inducidas a escala de laboratorio. Una parte alícuota del sobrenadante, 16 microlitros, en condiciones no reductoras, se cargó en un gel de acrilamida SDS-PAGE y se analizó mediante transferencia de Western usando un anticuerpo anti-4D5 policlonal de conejo, seguido por un anticuerpo anti-conejo (1/2000) de cabra o un anticuerpo anti-cadena ligera Kappa humana conjugado con HRP (1/1000) de cabra, para confirmar la identidad y tamaño de la proteína recombinante. La flecha indica la VB6-845 (construcción de la Figura 3) de longitud completa y la VB6-845-CL-de-bouganina (construcción de la Figura 6). El análisis de transferencia de Western del sobrenadante de cultivo de células E104 no inducidas no reveló bandas correspondientes lo que demuestra la especificidad de los anticuerpos (no mostrado).

Los resultados de los ensayos de reactividad con VB6-845 (Figura 3) y VB6-845-CL-de-bouganina (Figura 6) con respecto a las líneas celulares Ep-CAM positivas CAL 27 y NIH:OVCAR-3 en comparación con un control (línea celular Ep-CAM-negativa, A-375) se ilustran en la Figura 10A. Los resultados fueron comparables a los mismos ensayos de reactividad realizados con otra construcción anti-Ep-CAM, VB6-845-gelonina, en el que la de-bouganina está sustituida por otra toxina vegetal, la gelonina (Véase Figura 14C que muestra su secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 26) y secuencia de ácido nucleico (SEC ID N°: 25). Los resultados del ensayo de reactividad con la construcción de gelonina se ilustran en la Figura 10B. La adición de un segundo dominio de de-bouganina en la molécula con la orientación óptima no produjo ningún producto.

Se realizaron ensayos de citometría de flujo incubando las construcciones o el control con $0,45 \times 10^6$ células durante una hora en hielo. Después de lavado, las construcciones unidas a la superficie celular se detectaron con un anti-bouganina de conejo (de la Figura 10A) o anti etiqueta His de ratón (Figura 10B) durante una hora en hielo. Las células se lavaron y se incubaron con anti IgG de conejo de cabra conjugado con FITC (Figura 10A) y anti (IgG) de ratón de oveja conjugado con FITC (Figura 10B) durante 30 minutos en hielo. Posteriormente las células se lavaron, se resuspendieron en PBS FCS al 5 % que contenía yoduro de propidio para evaluar la unión del anticuerpo por citometría de flujo. No se detectaron cambios en la mediana de la fluorescencia después de incubación con VB6-845 y VB6-845-CL-de-bouganina con A-375. Por otro lado, se observó un cambio notable en la mediana de la fluorescencia con líneas celulares Ep-CAM positivas, CAL 27 y NIH:OVCAR-3 (Figura 10A). Como se ha indicado anteriormente, los resultados con VB6-845 fueron similares con la construcción de gelonina (Figura 10B).

Especificidad de Ep-CAM

Un ensayo de competencia de VB6-845 (construcción de la Figura 3) con Proxinium™, un formato scFv de VB6-845, pero que contenía exotoxina A de *Pseudomonas*, demostró que la especificidad Ep-CAM de VB6-845 permanecía sin modificar cuando se modificaba genéticamente en un formato Fab (Figura 11).

La Figura 11 ilustra los resultados de citometría de flujo del ensayo de competencia, con VB6-845 a 1 y 10 µg/ml y concentración en aumento de Proxinium™, que variaba de 0 a 100 µg/ml, cuando se incubó con células NIH:OVCAR-3 (línea celular tumoral Ep-CAM positiva). Después de 1 hora de incubación a 4 °C, las células se lavaron y la VB6-845 unida se detectó con un anti-bouganina de conejo biotinilado seguido de estreptavidina-citocromo. Se realizó el mismo experimento con 4B5-PE que se usó como un control negativo. Las condiciones de la reacción fueron como se indica en la Figura 11.

Fuerza (actividad biológica)

Adicionalmente, ensayos acelulares (Figura 12) y con MTS (Figura 13A y B) demostraron que la de-bouganina conservaba su fuerza cuando se conjugaba con el fragmento Fab. El ensayo con MTS para medir la fuerza se realizó usando técnicas convencionales conocidas en la materia, y como se describe más detalladamente a continuación en el Ejemplo 8. Usando las líneas celulares Ep-CAM-positivas, CAL 27 y NIH:OVCAR-3, el valor CI₅₀ de VB6-845 fue de 3 a 4 nM y de 2 a 3 nM, respectivamente. En el caso de VB6-845-C_L-de-bouganina, la fuerza se midió a de 1 a 2 nM para CAL 27 y de 0,6 a 0,7 nM frente a NIH:OVCAR-3. El desarrollo de la construcción Fab anti-Ep-CAM, que comprende un fragmento de anticuerpo diana tumoral humano unido a una bouganina desimmunizada debería permitir repetir la administración sistémica de este fármaco y producir un beneficio clínico mayor.

Recogida de las construcciones

Las construcciones pueden aislarse de los cultivos celulares por técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, si una etiqueta His se coloca en el extremo N de la construcción peptídica, la proteína Fab-bouganina puede

purificarse usando un procedimiento de captura quelante con Ni²⁺. Como un ejemplo se usó el siguiente protocolo.

La realización de la fermentación de alimentación discontinua de variantes VB6-845 se realizó en un fermentador CHEMAP de 15 l usando medio TB. A una DO₆₀₀ de 20 (semi-log), el cultivo se indujo con una mezcla de alimentación e inductor que contenía glicerol al 50 % y L-arabinosa 200 g/l. A las 30 horas postinducción, el cultivo se recogió, se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos y las variantes VB6-845 se purificaron usando sepharose CM y columnas de sepharose quelantes cargadas con metal seguido de una columna de exclusión de tamaño. Brevemente, el sobrenadante se concentró y se diafiltró frente a fosfato sódico 20 mM pH 6,9 ± 0,1. El sobrenadante concentrado diafiltrado se aplicó después sobre una columna de sepharose CM equilibrada con fosfato sódico 20 mM, NaCl 25 mM, pH 6,9 ± 0,1. La columna se lavó con fosfato sódico 20 mM, NaCl 25 mM, pH 6,9 ± 0,1, VB6-845 unido se eluyó posteriormente con fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM pH 7,5 ± 0,1. El eluado de sepharose CM se ajustó para conseguir una concentración final de Tritón-X100 a 0,25 % y se aplicó a una columna de sepharose quelante cargada. La columna de sepharose quelante se lavó después con 3 tampones de lavado diferentes comenzando con fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, tritón-X100 al 0,25 %, pH 7,5 ± 0,1 seguido de fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5 ± 0,1 y seguido de fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 10 mM, pH 7,5 ± 0,1. Después VB6-845 unido se eluyó con fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 250 mM pH 7,5 ± 0,1 y se recogió en fracciones de 2 ml. Se determinó la absorbancia a A₂₈₀ para cada fracción y las fracciones con material agrupado se aplicaron sobre una columna de exclusión de tamaño S200 para obtener una pureza de >80 %. En una realización, para aumentar la pureza de la proteína y extraerla y retirar la endotoxina, la fracción SEC agrupada se diluyó 5 veces con NaPO₄ 20 mM, pH 7,5 y se hizo pasar a través de una columna de flujo rápido de 15 ml Q-sepharose equilibrada con NaPO₄ 20 mM, NaCl 25 mM pH 7,5 a un caudal de aproximadamente 5 ml/min. Después de la aplicación de la muestra a través de la columna, la columna se lavó con 10CV de tampón de equilibrio y el lavado se agrupó con el flujo continuo de Q-sepharose inicial. El eluyente se concentró a ~10 veces mediante el uso de una membrana de MWCO de 30 kDa (membrana Sartorius hidrosart) para conseguir una concentración final de 7,5 mg/ml. Después, se añadió Tween-80 a una concentración final de 0,1 %. El producto final se filtró de manera estéril y se conservó a -80 °C. Las muestras en cada una de las etapas del proceso se analizaron mediante transferencia de Western después de inmunotransferencia con el anticuerpo anti-4D5. La pureza se confirmó mediante tinción con azul coloidal. El nivel de expresión de variantes VB6-845 se determinó mediante análisis de transferencia de Western y ELISA.

Ejemplo 8: Caracterización funcional y biológica de VB6-845, un anticuerpo Fab específico de Ep-CAM recombinante genéticamente unido con la Bouganina des-inmunizada (de-bouganina).

Los agentes quimioterapéuticos son agentes muy citotóxicos que a menudo representan el patrón de cuidado en el tratamiento de muchos de los cánceres tumorales sólidos. La acción citotóxica de estos fármacos diana rápidamente divide las células, normales y tumorales, creando así diversos efectos secundarios clínicos adversos. VB6-845 es un anticuerpo Fab unido a una forma desinmunizada de la toxina derivada de planta bouganina. A diferencia de los agentes quimioterapéuticos que carecen de especificidad diana tumoral definida, VB6-845 limita su efecto citolítico contra dianas tumorales Ep-CAM positivas en solitario. En este estudio, el análisis de citometría de flujo y citotoxicidad se midieron para evaluar la fuerza y selectividad de VB6-845.

Citometría de flujo

En este estudio se usaron líneas celulares tumorales adquiridas de la ATCC y se propagaron siguiendo las recomendaciones de la ATCC excepto para las líneas celulares C41, TOV-112D que se cultivaron en RPMI 1640 o DMEM complementado con FCS al 10 %, respectivamente. Las células tumorales se recogieron a una confluencia de 60-70 % con una viabilidad de más del 90 %. Las células epiteliales mamarias normales humanas (HMEC) se adquirieron en CAMBREX y se conservaron en medios específicos de acuerdo con el procedimiento proporcionado por CAMBREX. Las células se recogieron a una confluencia del 70 % con una viabilidad de más del 90 %.

Las líneas celulares ginecológicas de indicios de cáncer endometrial, de ovario y de cuello uterino se ensayaron con respecto a la unión de VB6-845 en citometría de flujo (Tabla 9). Se añadieron diez microgramos/ml de VB6-845 a cada línea celular (3 x 10⁵ células) y se incubó durante 2 horas a 4 °C. Se usaron como controles de líneas celulares positivas y negativas A-375 y CAL 27, respectivamente. Después de lavar el material no unido, se añadió un anticuerpo anti-Histidina monoclonal de ratón (Amersham Pharmacia, Cat N° 27471001) diluido 1/800 en PBS que contenía FCS al 10 % y se incubó durante 1 hora más a 4 °C. Posteriormente, se añadió un anti-IgG de ratón marcado con FITC (The Binding Site, Cat N° AF271) diluido 1/100 en PBS-FCS al 10 % y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Finalmente, las células se analizaron en una FACS Calibur después de tinción con yoduro de propidio para dejar salir las células muertas.

Citotoxicidad

El nivel de destrucción de VB6-845 en células indicadas en el estudio de citometría de flujo es como se indica en la Tabla 10, que indica que la construcción conservó su actividad citotóxica de-bouganina contra líneas celulares Ep-CAM positivas. La citotoxicidad fue comparable a otra variante Fab VB6-845 que contenía una toxina diferente derivada de planta, gelonina (Figura 14). La Figura 14A compara la citotoxicidad de la gelonina, la construcción Fab anti-Ep-CAM gelonina (VB6-845-Gelonina) y la construcción Fab anti-Ep-CAM-de-bouganina (Bou156) (VB6-845) en células CAL 27 (Figura 14A) y NIH:OVCA-3 (Figura 14B). La secuencia de ácidos nucleicos y aminoácidos de la construcción VB6-

845-gelonina se ilustra en la Figura 14C.

Para estudiar la especificidad y selectividad de VB6-845 (Construcción de la Figura 3), la actividad citotóxica de VB6-845 (pureza del 90 %) se ensayó frente a las líneas celulares Ep-CAM-positivas (NIH:OVCAR-3) y Ep-CAM-negativas (HMEC, DAUDI, A-375) (Tabla 11) junto con 17 fármacos quimioterapéuticos (LKB Laboratories Inc.).

- 5 Se realizaron ensayos con MTS usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Más particularmente, se sembraron 50 microlitros de células (2×10^4 células/ml) por pocillo y las placas se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 2 horas. Después, se añadieron 50 microlitros de fármaco incorporado (es decir la construcción a ensayar o control) al medio de cultivo a concentraciones en aumento. Se usó medio de cultivo, sin o con células, como controles positivos y negativos, respectivamente. Las placas se dejaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 5 días. El día 5, la inhibición de la proliferación celular se evaluó añadiendo 20 microlitros de reactivo MTS (Promega, Cat N° G5430). Después las placas se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 2 horas y las DO se leyeron a 490 nm usando el espectrómetro lector de placas. Se restaron los valores de fondo de los valores de la muestra obtenidos para cada concentración y los resultados se expresaron como un porcentaje de células viables. Los valores CI₅₀ para cada fármaco se calcularon para cada línea celular.
- 10
- 15 Cuando se ensayó con respecto a la citotoxicidad contra NIH:OVCAR-3, un carcinoma de ovario Ep-CAM-positivo, usando un panel de agentes quimioterapéuticos convencionales, VB6-845 mostró que era más fuerte que 12 de los 17 fármacos ensayados. (Tabla 11). Aunque 5 agentes quimioterapéuticos fueron más citotóxicos, también mostraron que era bastante más tóxicos ya que carecían de cualquier destrucción específica de célula. De los 5 agentes quimioterapéuticos recomendados para el tratamiento del cáncer de ovario (Paclitaxel, Carboplatino, Cisplatino, Doxorubicina y Topotecán), solo dos (Paclitaxel y Topotecán) eran más citotóxicos. Aunque VB6-845 demostró una actividad citolítica altamente fuerte en el intervalo de 1 a 2 nM, la fuerza de destrucción se limitó exclusivamente a la línea celular tumoral Ep-CAM positiva NIH:OVCAR-3. Aunque se mostró alguna destrucción de las líneas celulares Ep-CAM-negativas con VB6-845, el efecto citotóxico fue al menos 220 veces y a lo sumo >1000 veces menos tóxico. Por tanto VB6-845 representa una alternativa de tratamiento fuerte dirigida contra anticuerpos de
- 20
- 25 agentes quimioterapéuticos que cuando se combinan con el perfil citotóxico más bajo, es más prometedor en el tratamiento de muchos tipos diferentes de tumores sólidos.

Ejemplo 9: VB6-011: la modificación por ingeniería genética recombinante de un anticuerpo Fab específico de antígeno asociado a tumor para la administración óptima de la bouganina des-inmunizada (De-bouganina).

- 30 Las citotoxinas que se dirigen a tumores están formadas por la región variable de un anticuerpo unido a una toxina bacteriana, fúngica o vegetal. El presente estudio ilustra que las construcciones de bouganina desinmunizada de la invención, comprenden bouganina desinmunizada unida a un resto diana tienen una inmunogenicidad reducida, aunque conservan su actividad biológica. La TABLA 13 demuestra la unión del anticuerpo antigénico asociado a tumor de diversos tipos de tumores y por tanto muestra que puede usarse para tratar estos tipos de cánceres.

- 35 Construcción de bouganina des-inmunizada: resto de dirección dirigido a antígeno asociado a tumor unido a de-bouganina

- El anticuerpo H11, un anticuerpo monoclonal que reconoce antígenos asociados a tumores, se engarzó genéticamente a una forma desinmunizada de bouganina (de-bouganina), Bou 156, una fuerte proteína inactivadora de ribosomas (RIP) de tipo I derivada de plantas, para crear la construcción anticuerpo-toxina VB6-011. La Figura 15 ilustra la secuencia codificante de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos. El ensayo de esta construcción, ilustra que la construcción conserva su actividad biológica (citotoxicidad).
- 40

Fuerza (actividad biológica)

El ensayo con MTS demostró que la de-bouganina conservó su fuerza cuando se conjugaba con el fragmento Fab (Figura 16). El ensayo con MTS usado para medir la fuerza se realizó usando una técnica convencional conocida en la materia y como se describe con más detalle en el Ejemplo 8.

- 45 Citotoxicidad

- Para estudiar la especificidad y selectividad de VB6-011, se ensayó la actividad citotóxica contra células MB-435S. El ensayo con MTS se realizó usando técnicas convencionales conocidas en la materia. Más particularmente, se sembraron 50 microlitros de células (2×10^4 células/ml) por pocillo y las placas se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 2 horas. Después, se añadieron 50 microlitros de fármaco añadido (es decir construcción a ensayar o control) al medio de cultivo a concentraciones en aumento. El medio de cultivo, con o sin células, se usó como controles positivo y negativo, respectivamente. Las placas se dejaron a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 5 días. El día 5, la inhibición de la proliferación celular se evaluó añadiendo 20 microlitros de reactivo MTS (Promega, Cat N° G5430). Después las placas se incubaron adicionalmente a 37 °C con CO₂ al 5 % durante 2 horas y las DO se leyeron a 490 nm usando el espectrofotómetro del lector de placa. Los valores de fondo se restaron de los valores de la muestra obtenidos para cada concentración y los resultados se expresaron como un porcentaje de células viables. Los resultados muestran que el valor CI₅₀ de VB6-011 es de 350 nM.
- 50
- 55

Tabla 1

Péptido Nº	Posición del primer aminoácido	SEC ID Nº	Secuencia	Péptido	Posición del primer aminoácido	SEC ID Nº	Secuencia
1	1	32	YNTVSFNLGEAYEYP	46	136	77	EFSIEAIHGKTINGQ
2	4	33	VSFNLGEAYEYPTFI	47	139	78	IEAIHGKTINGQEIA
3	7	34	NLGEAYEYPTFIQDL	48	142	79	IHGKTINGQEIAKFF
4	10	35	EAYEYPTFIQDLRNE	49	145	80	KTINGQEIAKFFLIV
5	13	36	EYPTFIQDLRNELAK	50	148	81	NGQEIAKFFLIVIQM
6	16	37	TFIQDLRNELAKGTP	51	151	82	EIAKFFLIVIQMVSE
7	19	38	QDLRNELAKGTPVCQ	52	154	83	KFFLIVIQMVSEAR
8	22	39	RNELAKGTPVCQLPV	53	157	84	LIVIQMVSEARFKY
9	25	40	LAKGTPVCQLPVTLQ	54	160	85	IQMVSEARFKYIET
10	28	41	GTPVCQLPVTLQTI	55	163	86	VSEARFKYIETEVV
11	31	42	VCQLPVTLQTIADDK	56	166	87	AARFKYIETEVVDRG
12	34	43	LPVTLQTIADDKRFV	57	169	88	FKYIETEVVDRGLYG
13	37	44	TLQTIADDKRFVLVD	58	172	89	IETEVVDRGLYGSFK
14	40	45	TIADDKRFVLVDITT	59	175	90	EVVDRGLYGSFKPNF
15	43	46	DDKRFVLVDITTTSK	60	178	91	DRGLYGSFKPNFKVL
16	46	47	RFVLVDITTTSKKTV	61	181	92	LYGSFKPNFKVLNLE
17	49	48	LVDITTTSKKTVKVA	62	184	93	SFKPNFKVLNLENNW
18	52	49	ITTTSKKTVKVAIDV	63	187	94	PNFKVLNLENNWGD
19	55	50	TSKKTVKVAIDVTDV	64	190	95	KVLNLENNWGDISDA
20	58	51	KTVKVAIDVTDVYVV	65	193	96	NLENNWGDISDAIHK
21	61	52	KVAIDVTDVYVVGYYQ	66	196	97	NNWGDISDAIHKSSP
22	64	53	IDVTDVYVVGYYQDKW	67	199	98	GDISDAIHKSSPQCT
23	67	54	TDVYVVGYYQDKWDGK	68	202	99	SDAIHKSSPQCTTIN
24	70	55	YVVGYYQDKWDGKDRA	69	205	100	IHKSSPQCTTINPAL
25	73	56	GYQDKWDGKDRAVFL	70	208	101	SSPQCTTINPALQLI
26	76	57	DKWDGKDRAVFLDKV	71	211	102	QCTTINPALQLISPS
27	79	58	DGKDRAVFLDKVPTV	72	214	103	TINPALQLISPSNDP
28	82	59	DRAVFLDKVPTVATS	73	217	104	PALQLISPSNDPWVV
29	85	60	VFLDKVPTVATSKLF	74	220	105	QLISPSNDPWVVNKV
30	88	61	DKVPTVATSKLFPV	75	223	106	SPSNDPWVVNKVSQI
31	91	62	PTVATSKLFPVGTNR	76	226	107	NDPWVVNKVSQISPD
32	94	63	ATSKLFPVGTNRVTL	77	229	108	WVVNKVSQISPDMDGI

ES 2 424 643 T3

33	97	64	KLFPGVTNRVTLTFD	78	232	109	NKVSQISPDMGILKF
34	100	65	PGVTNRVTLTFDGSY	79	235	110	SQISPDMGILKFKSS
35	103	66	TNRVTLTFDGSYQKL	80	238	111	SPDMGILKFKSSKLT
36	106	67	VTLTFDGSYQKLVNA	81	240	112	MGILKFKSSKLTQFA
37	109	68	TFDGSYQKLVNAAKV	82	243	113	LKFKSSKLTQFATMI
38	112	69	GSYQKLVNAAKVDRK	83	246	114	KSSKLTQFATMIRSA
39	115	70	QKLVNAAKVDRKDLE	84	249	115	KLTQFATMIRSAIVE
40	118	71	VNAAKVDRKDLELGV	85	252	116	QFATMIRSAIVEDLD
41	121	72	AKVDRKDLELGVYKL	86	255	117	TMIRSAIVEDLDGDE
42	124	73	DRKDLELGVYKLEFS	87	258	118	RSAIVEDLDGDELEI
43	127	74	DLELGVYKLEFSIEA	88	261	119	IVEDLDGDELEILEP
44	130	75	LGVYKLEFSIEAIHG	89	264	120	DLDGDELEILEPNIA
45	133	76	YKLEFSIEAIHGKTI				

Péptidos de la secuencia de bouganina. Los restos subrayados no están presentes en la proteína madura

Tabla 2

Donante Nº	Código de almacenamiento de donante	Alotipo
1	BC63	DRB1*04, DRB1*07, DRB4*01
2	BC86	DRB1*04, DRB1*15, DRB5
3	BC90	DRB1*07, DRB1*15, DRB4*01, DRB5
4	BC134	DRB1*01, DRB1*03, DRB3
5	BC167	DRB1*01, DRB1*07 y DRB4*01
6	BC216	DRB1*14, DRB1*15, DRB3, DRB5
7	BC217	DRB1*04, DRB1*12, DRB3, DRB4*01
8	BC233	DRB1*04, DRB1*11 y DRB3, DRB4*01
9	BC241	DRB1*07, DRB1*11, DRB3, DRB4*01
10	BC246	DRB1*01, DRB1*13 y DRB3
11	BC262	DRB1*03, DRB1*07, DRB3, DRB4*01
12	BC292	DRB1*07, DRB1*13, DRB3, DRB4*01
13	BC293	DRB1*04, DRB1*10, DRB4*01
14	BC231	DRB1*03 o DRB1*03, DRB1*13 y DRB3
15	BC301	DRB1*07, DRB1*14, DRB3
16	BC326	DRB1*03, DRB1*15, DRB3, DRB5
17	BC316	DRB1*13, DRB1*15, DRB3, DRB5
18	BC321	DRB1*01, DRB1*15, DRB5
19	BC382	DRB1*04, DRB1*08, DRB4*01
20	BC336	DRB1*01, DRB1*11, DRB3

Alotipos MHC de donantes PBMC

Tabla 3

Cebador	SEC ID N°	Secuencia
OL1032	121	CATTACAAACGTCTACCAAGTTT
OL1033	122	TTACAAAAGTAGATAAGTAATGTG
OL1322	123	GATATACATATGAAATACCTATTGCCTACG
OL1067	124	TGACACAGTGTGTACGCTGGTTGGGCAGCGAGTAA
OL1068	125	GCTGCCCAACCAGCGTACAACACTGTGTCATTTAAC
OL1323	126	CGAGTGCGGCCGCTCAATGGTGATGGTGATGGTGT

Secuencias de cebadores usados en la construcción del gen de bouganina de tipo silvestre (WT)

Tabla 4

Las variantes de bouganina de sustitución sencilla construidas y ensayadas.			
Mutación	Mutaciones de Nucleótidos	Actividad en el ensayo luciferasa*	Clon ID**
Control negativo			
Y70A	TAT-GCT		BouY70A
Región Epitópica R1 (péptido 41)			
V123T	GTG-ACG	+/-	Bou2
V123A	GTG-GCT	++	Bou3
V123D	GTG-GAT	--	-
V123E	GTG-GAA	--	-
V123G	GTG-GGC	--	-
V123H	GTG-CAC	--	-
V123K	GTG-AAG	--	-
V123N	GTG-AAC	--	-
V123P	GTG-CCT	--	-
V123Q	GTG-CAA	++	Bou4
V123R	GTG-AGA	--	-
V123S	GTG-TCA	--	-
D127G	GAT-GGC	++	Bou5
D127A	GAT-GCT	++	Bou6
E129K	GAA-AAG	--	-
E129R	GAA-AGA	--	-
E129Q	GAA-CAA	+/-	Bou7
E129G	GAA-GGC	++	Bou8
Región Epitópica R2 (péptido 44)			
Y133P	TAC-CCC	--	-
Y133N	TAC-AAC	++	Bou9

ES 2 424 643 T3

Y133T	TAC-ACA	++	Bou10
Y133A	TAC-GCT	++	Bou11
Y133R	TAC-AGA	++	Bou12
Y133D	TAC-GAT	++	Bou13
Y133E	TAC-GAA	+/-	Bou14
Y133Q	TAC-CAA	++	Bou15
Y133G	TAC-GGC	++	Bou16
Y133H	TAC-CAC	++	Bou17
Y133K	TAC-AAG	++	Bou18
Y133S	TAC-TCA	++	Bou19
Región Epitópica R3 (péptido 50)			
E151T I152E	GAGATA-ACGGAA	--	-
I152Q	ATA-CAA	++	Bou20
I152A	ATA-GCA	++	Bou21
I152E	ATA-GAA	--	-
F155P	TTC- CCA	--	-
F155H	TTC-CAC	--	-
I158P	ATT-CCA	--	-
*Actividad en el ensayo Luciferasa:			
++ = la misma o mayor que la de la proteína de tipo silvestre (WT). + = dentro de 2 veces de actividad de tipo silvestre (WT). +/- = dentro de 3 veces de actividad de tipo silvestre (WT). - = menos de un tercio de actividad de tipo silvestre (WT). WT = Proteína de tipo silvestre.			
** Clon ID. Denominaciones solo de variantes funcionalmente activas.			

Tabla 5

Las variantes de bouganina de sustitución múltiple construidas y ensayadas.					
Clon ID	Región Epitópica R1 (péptido 41)		Región Epitópica R2 (péptido 44)	Región Epitópica R3 (péptido 51)	Actividad en ensayo luciferasa
Bou143	V123Q		Y133Q	I152Q	++
Bou144	V123A		Y133N	I152A	++
Bou145	V123A		Y133Q	I152A	++
Bou146	V123A	D127G			++
Bou147	V123A	D127A			++
Bou148	V123Q	D127G			++
Bou149	V123Q	D127A			++
Bou150	V123Q	E129G			+
Bou151	V123A	E129G			+

ES 2 424 643 T3

Bou156	V123A	D127A	Y133N	I152A	++
Bou157	V123A	D127A	Y133Q	I152A	++

*Actividad en ensayo Luciferasa:

++ = la misma o mayor que la de la proteína de tipo silvestre (WT). + = dentro de 2 veces de actividad de tipo silvestre (WT). +/- = dentro de 3 veces de actividad de tipo silvestre (WT). - = menos de un tercio de actividad de tipo silvestre (WT). WT = Proteína de tipo silvestre.

Tabla 6

Clon ID	Sustitución o sustituciones*	Proteína
Bou32	WT	SEC ID N° 1
Bou156	V123A, D127A, Y133N, I152A	SEC ID N° 13
Bou157	V123A, D127A, Y133Q, I152A	SEC ID N° 14
Bou143	V123Q, Y133Q, I152Q	
Bou144	V123A, Y133N, I152A	
Bou145	V123A, Y133Q, I152A	
Bou146	V123A, D127G	
Bou147	V123A, D127A	
Bou148	V123Q, D127G	
Bou149	V123Q, D127A	
Bou150	V123Q, E129G	
Bou151	V123A, E129G	
Bou2	V123T	
Bou3	V123A	
Bou4	V123Q	
Bou5	D127G	
Bou6	D127A	
Bou7	E129Q	
Bou8	E129G	
Bou9	Y133N	
Bou10	Y133T	
Bou11	Y133A	
Bou12	Y133R	
Bou13	Y133D	
Bou14	Y133E	
Bou15	Y133Q	
Bou16	Y133G	
Bou17	Y133H	
Bou18	Y133K	
Bou19	Y133S	
Bou20	I152Q	

Clon ID	Sustitución o sustituciones*	Proteína
Bou21	I152A	
* La numeración comienza desde el resto 1 de la fase de lectura de la bouganina y por lo tanto excluye una secuencia líder PeIB incluida en la mayoría de las construcciones.		

Tabla 7

SEC ID Nº 1

Proteína

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVY
VVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKVDRKDLELG VYKLEFSIE
AIHGKTINGQEIAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSP
QCTTINPALQLISPSNDPWVVKVQSISPDMGILKFKSSK

SEC ID Nº 13

Proteína

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLVDITTTSKKTVKVAIDVTDVY
VVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELG VNKLEFSIE
AIHGKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVLNLENNWGDISDAIHKSSP
QCTTINPALQLISPSNDPWVVKVQSISPDMGILKFKSSK

Tabla 8

Péptidos modificados y de tipo silvestre (WT) de la Bouganina ensayada adicionalmente en ensayos con linfocitos T

Péptido número	Posición del primer aminoácido dentro de la bouganina	Secuencia*	SEC ID Nº
Del-41	121-135	AK <u>ADR</u> KALELG <u>VN</u> KL	29
Del-44	130-144	LG <u>VN</u> KLEFSIEAIHG	30
Del-50	149-163	NGQE <u>AA</u> KFFLIVIQM	31

*Los restos (mutantes) sustituidos se subrayan.

Tabla 9

Unión de VB6-845 a líneas celulares ginecológicas por citometría de flujo. Los resultados se expresan como un factor de aumento en MF ± ETM.

Indicación	Líneas celulares	VB6-845 (factor de aumento MF ± ETM)
Endometrial	HEC-1-A	42,3 ± 0,9
	RL95-2	4,9 ± 0,7
	SK-UT-1	1,1 ± 0,1
Ovario	NIH:OVCAR-3	33,6 ± 6,0
	SK-OV-3	4,3 ± 1,0
	TOV-112G	1,1 ± 0,1
Cervical	HT-3	29,1 ± 1,2
	C-4I	6,8 ± 0,6
	C-33A	1,1 ± 0,0
Melanoma	A-375	11 ± 0,1

Tabla 10

Citotoxicidad mediada por VB6-845 mediante ensayo con MTS		
Indicación	Línea celular	Cl ₆₀ nM VB6-845 pureza 70 %
Endometrial	HEC-1-A	43
	KLE	>100
	RL95-2	100
Ovario	NIH-OVCAR-3	3,4
	Caov-3	1,3
	SK-OV-3	>100
Cervical	MS751	0,43
	HT-3	23
	ME-180	37
	C-4I	1,7
Melanoma	A-375	>100

Tabla 11

	Especificidad y selectividad de VB6-845 frente a agentes quimioterapéuticos			
	NIH:OVCAR-3	A-375	Cl ₅₀ nM DAUDI	HMEC
Paclitaxel	<10 ⁻⁶	4,9x10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶
Docetaxel	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶
Vincristina	4,4x10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶
Sulfato Vinblastina	1,1x10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶	<10 ⁻⁶
Topotecán	0,071	1,5	0,009	4,1
VB6-845 (pureza 90 %)	1	>1000	>1000	220
Doxorrubicina	3	2,8	16x10 ⁻⁶	16
Mitomicina C	28	14	2,8	50
Sulfato de Bleomicina	30	170	22	600
Bleomicina A5	150	290	130	1000
Irinotecán	180	900	190	1000
Etopósido	210	280	1,7	600
Metotrexato	>1000	6	3,6	41
Clorambucilo	>1000	>1000	>1000	>1000
Fluorouracilo	>1000	>1000	>1000	>1000
Ciclofosfamida	>1000	>1000	>1000	>1000
Cisplatino	>1000	>1000	>1000	>1000
Carboplatino	>1000	>1000	>1000	>1000

Tabla 12: indicaciones de células tumorales VB6-845

INDICACIONES	N ¹	Unión para scFv 845 (lgG) ²
Gástrico	3	148,9
Ovario	2	84,1
Esofágico	3	72,4
Vejiga	14	59,6
Próstata	5	50,1
Cervical	3	37,5
Endometrial	1	23,8
Pulmón	3	16,4
Cabeza y cuello	2	11,4
Riñón	3	9,4
Páncreas	3	5,5
Melanoma	3	1,6
¹ N indica el número de líneas celulares ensayadas por indicación. ² Factor de aumento medio en mediana de fluorescencia sobre el anticuerpo control de todas las líneas celulares en cada indicación.		

Tabla 13: indicaciones de células tumorales VB6-011

INDICACIONES	N ¹	Unión para mAb 011 (lgG) ²
Mama	3	16,9
Próstata	3	15,1
Melanoma	3	14,0
Pulmón	3	13,1
Ovario	2	11,1
Colon	3	8,7
Riñón	3	6,9
Hígado	2	6,5
Páncreas	3	4,2
Cabeza y cuello	2	2,9
¹ N indica el número de líneas celulares ensayadas por indicación. ² Los valores indican la media calculada a partir de la suma de la media del factor de aumento en la mediana de fluorescencia sobre el anticuerpo control de todas las líneas celulares en cada indicación. Un valor cero significaría reactividad no medible con respecto a la actividad control		

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> BAKER, Matthew CARR, Francis J. HELLENDORRN, Koen CIZEAU, Jeannick MACDONALD, Glen Christopher ENTWISTLE, Joycelyn BOSCH, Denis Georges GLOVER, Nicholas Ronald
- <120> PROTEÍNAS BOUGAININA MODIFICADAS, CITOTOXINAS Y PROCEDIMIENTOS Y USOS DE LAS MISMAS
- 10 <130> 10241-43
- <140>
- <141>
- 15 <150> US 60/554,580
- <151> 19-03-2004
- <150> US 60/630.571
- <151> 26-11-2004
- 20 <160> 129
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 25 <211> 250
- <212> PRT
- <213> Bougainvillea *spectabilis* Willd
- 30 <400> 1

```

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1          5          10          15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
          20          25          30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
          35          40          45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
          50          55          60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
65          70          75          80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
          85          90          95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly

```

ES 2 424 643 T3

	100		105		110										
Ser	Tyr	Gln	Lys	Leu	Val	Asn	Ala	Ala	Lys	Val	Asp	Arg	Lys	Asp	Leu
		115					120					125			
Glu	Leu	Gly	Val	Tyr	Lys	Leu	Glu	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Ile	His	Gly
	130					135					140				
Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala	Lys	Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Ile
145					150					155					160
Gln	Met	Val	Ser	Glu	Ala	Ala	Arg	Phe	Lys	Tyr	Ile	Glu	Thr	Glu	Val
				165					170					175	
Val	Asp	Arg	Gly	Leu	Tyr	Gly	Ser	Phe	Lys	Pro	Asn	Phe	Lys	Val	Leu
			180					185					190		
Asn	Leu	Glu	Asn	Asn	Trp	Gly	Asp	Ile	Ser	Asp	Ala	Ile	His	Lys	Ser
		195					200						205		
Ser	Pro	Gln	Cys	Thr	Thr	Ile	Asn	Pro	Ala	Leu	Gln	Leu	Ile	Ser	Pro
	210					215					220				
Ser	Asn	Asp	Pro	Trp	Val	Val	Asn	Lys	Val	Ser	Gln	Ile	Ser	Pro	Asp
225					230					235					240
Met	Gly	Ile	Leu	Lys	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys						
				245					250						

<210> 2
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 2

Ala	Lys	Val	Asp	Arg	Lys	Asp	Leu	Glu	Leu	Gly	Val	Tyr	Lys	Leu
1				5				10					15	

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 3

Leu	Gly	Val	Tyr	Lys	Leu	Glu	Phe	Ser	Ile	Glu	Ala	Ile	His	Gly
1				5				10					15	

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis

ES 2 424 643 T3

<400> 4

Asn Gly Gln Glu Ile Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met
 1 5 10 15

5

<210> 5
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30

<400> 5

Ala Lys Xaa Asp Arg Lys Xaa Leu Xaa Leu Gly Val Xaa Lys Leu
 1 5 10 15

35

<210> 6
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

40

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45

<400> 6

Leu Gly Val Xaa Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
 1 5 10 15

50

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

55

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

60

<400> 7

ES 2 424 643 T3

Asn Gly Gln Glu Xaa Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met
1 5 10 15

5 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa puede ser T o A o Q

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa puede ser G o A

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa puede ser Q o G

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S

<400> 8

Ala Lys Xaa Asp Arg Lys Xaa Leu Xaa Leu Gly Val Xaa Lys Leu
1 5 10 15

30 <210> 9
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S

<400> 9

Leu Gly Val Xaa Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
1 5 10 15

45 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser Q o A

55 <400> 10

Asn Gly Gln Glu Xaa Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met
1 5 10 15

ES 2 424 643 T3

5
 <210> 11
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (123)..(123)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

15
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (127)..(127)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (129)..(129)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (133)..(133)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (152)..(152)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 11

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
20 25 30

ES 2 424 643 T3

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
 35 40 45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
 50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
 65 70 75 80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
 85 90 95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
 100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Xaa Asp Arg Lys Xaa Leu
 115 120 125

Xaa Leu Gly Val Xaa Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
 130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Xaa Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
 145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
 165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
 180 185 190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
 195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
 210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
 225 230 235 240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
 245 250

<210> 12
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (123)..(123)

5

10

<223> Xaa puede ser T o A o Q

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (127)..(127)

<223> Xaa puede ser G o A

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (129)..(129)

<223> Xaa puede ser Q o G

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (133)..(133)

<223> Xaa puede ser N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (152)..(152)

<223> Xaa puede ser Q o A

<400> 12

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
20 25 30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
35 40 45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
65 70 75 80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
85 90 95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Xaa Asp Arg Lys Xaa Leu
115 120 125

5

10

15

20

25

ES 2 424 643 T3

Xaa Leu Gly Val Xaa Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Xaa Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
180 185 190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
225 230 235 240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
245 250

<210> 13
<211> 250
<212> PRT
<213> Bougainvillea spectabilis

5

<400> 13

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
20 25 30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
35 40 45

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
65 70 75 80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
85 90 95

10

ES 2 424 643 T3

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
 100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu
 115 120 125

Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
 130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
 145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
 165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
 180 185 190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
 195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
 210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
 225 230 235 240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
 245 250

<210> 14
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

<400> 14

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
 1 5 10 15

Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
 20 25 30

Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
 35 40 45

5

10

ES 2 424 643 T3

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
 50 55 60

Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
 65 70 75 80

Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
 85 90 95

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
 100 105 110

Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu
 115 120 125

Glu Leu Gly Val Gln Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
 130 135 140

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
 145 150 155 160

Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
 165 170 175

Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
 180 185 190

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
 195 200 205

Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
 210 215 220

Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
 225 230 235 240

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
 245 250

<210> 15
 <211> 2404
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VB6-845

10

<400> 15

ES 2 424 643 T3

gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag 60
 tcataatgaa atacctattg cctacggcag ccgctggatt gttattactc gctgccaac 120
 cagcgatggc ggaagtacag ctggttcagt cgggccggg tcttgttcaa cgggtgggtt 180
 ccgttcgtat ctcttgcgct gcttctgggt acacgttcac caactacggc atgaactggg 240
 tcaaacaggc tccgggtaaa ggcttggat ggatgggctg gatcaacacc tacaccgggtg 300
 aatccacctc cgctgactcc ttcaaaggte gcttcacttt ctccctcgac acaagtgcta 360
 gtgctgcata cctccaaatc aactcgctgc gtgcagagga tacagcagtc tattactgcg 420
 cccgtttcgc tatcaaaggc gactactggg gtcaaggcac gctgctgacc gtttccctcg 480
 ctagcaccaa aggcccatcg gtcttcccc tggcacctc ctccaagagc acctctgggg 540
 gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acgggtgctg 600
 ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag 660
 gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct 720
 acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca 780
 aatcttgtag caggcacagg cagcccagag gctgggagca gctctacaac accgtgtcat 840
 ttaaccttgg agaagcttat gactaccca cttttataca agatttgcgc aatgaattgg 900
 ctaagggcac accagtatgt caacttccag tgacactaca aacctagcc gatgacaagc 960
 gatttgttct agttgatatc actacgacct cgaagaaaac agttaagggtt gctatagatg 1020
 tgacagatgt gtatgttggt gggtatcaag acaaatggga tggcaaagat cgagctgttt 1080
 tccttgacaa ggttcctact gttgcaacta gtaaactttt cccaggggtg actaatcgty 1140
 taacgttaac atttgatggc agctatcaga aacttgtgaa tgctgccaaa gctgatagaa 1200
 aggctctoga actgggggtt aacaaattgg aattttccat tgaagcaatc catggtaaaa 1260
 cgataaatgg tcaagaggca gccaaagtct ttcttattgt catccaaatg gtttcagagg 1320
 cagctcgggt caaatatatt gagactgagg tgggtgatag aggattatat ggatcattca 1380
 aacctaatc taaagtattg aacttggaga acaattgggg cgacatctct gatgccattc 1440
 acaaatcacc cccacaatgt accactatta atccggcact tcagttgata agcccccaa 1500
 atgaccatg gggtgtaaat aaagtgagtc aaattagtc cgatatgggt atccttaagt 1560
 ttaaaagctc caaatagtga tctagagtcg acctgcaggt ctatggaacg ataaatgccc 1620
 atgaaaattc tatttcaagg agacagtcac aatgaaatac ctattgccta cggcagccgc 1680
 tggattgta ttactcgctg cccaaccagc gatggcgcac catcatcaac atcacgatat 1740
 ccagatgacc cagtcctcgt cctccctgag tgcttctggt ggtgaccgtg ttaccatcac 1800
 ctgcccgtcc accaaatccc tcttgaactc caacggtatc acctacctt attggtatca 1860

ES 2 424 643 T3

acagaaaccg ggtaaagctc cgaaacttct gratctaccag atgtccaacc tggcttccgg 1920
 tgttccgtct cgtttctcca gttctgggtc tgggtaccgac ttcaccctga ccatctcttc 1980
 tctgcagccg gaagacttcg ctacctacta ctgctcag aacctggaaa tcccgcgtac 2040
 cttcgggtcag ggtaccaaag ttgaacttaa ggcgactgtg gctgcaccat ctgtcttcat 2100
 ctccccgcca tctgatgagc agttgaaatc tgggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa 2160
 taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg 2220
 taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag 2280
 caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac 2340
 ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gtagcttcaac aggggagagt gttagtagct 2400
 cgag 2404

<210> 16
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VB6-845

<400> 16

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly
 20 25 30
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45
 Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
 50 55 60
 Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
 85 90 95
 Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp

5

10

ES 2 424 643 T3

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

ES 2 424 643 T3

Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly
 370 375 380

Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val
 405 410 415

Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg
 420 425 430

Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu
 435 440 445

Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln
 450 455 460

Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp
 465 470 475 480

Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile
 485 490 495

Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala
 500 505 510

Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala His His His
 515 520 525

His His His Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 530 535 540

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu
 545 550 555 560

Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 565 570 575

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
 580 585 590

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 595 600 605

ES 2 424 643 T3

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 610 615 620

Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 625 630 635 640

Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 645 650 655

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 660 665 670

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 675 680 685

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 690 695 700

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 705 710 715 720

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 725 730 735

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 740 745 750

<210> 17
 <211> 1618
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VB5-845

<400> 17

gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag 60
 tcataatgaa atacctattg cctacggcag ccgctggatt gttattactc gctgcccâac 120
 cagcgatggc ggaagtacag ctggttcagt ccggcccggg tcttgttcaa cggggtggtt 180
 ccgttcgtat ctcttgcgct gttctgggtt acacgttcac caactacggc atgaactggg 240
 tcaaacaggc tccgggtaaa ggccctggaat ggatgggctg gatcaacacc tacaccggtg 300
 aatccaccta cgtgactcc ttcaaaggtc gttcacttt ctcctcgac acaagtgcta 360
 gtgctgcata cctccaaatc aactcgctgc gtgcagagga tacagcagtc tattactgcg 420
 cccgtttcgc tatcaaaggc gactactggg gtcaaggcac gctgctgacc gtttctcgg 480

ES 2 424 643 T3

ctagcacc_{aa} aggc_{cc}atcg gtctt_{cccc} tggcacc_{ctc} ctccaagagc acctctg_{ggg} 540
gcacagc_{ggc} cctggg_{ctgc} ctggtca_{agg} actactt_{ccc} cgaaccg_{gtg} acgggtg_{tcgt} 600
ggaactc_{agg} cgccctg_{acc} agcggc_{gtgc} acacctt_{ccc} ggctgtc_{cta} cagtcct_{cag} 660
gactctact_c cctcagc_{agc} gtgggtg_{accg} tgccctc_{cag} cagctt_{gggc} acccagac_{ct} 720
acatctg_{caa} cgtgaat_{cac} aagccc_{cagca} acacca_{aggt} ggacaag_{aaa} gttgag_{ccca} 780
aatcttg_{tta} gtgatct_{aga} gtcgac_{ctgc} aggtctat_{gg} aacgata_{aat} gcccatg_{aaa} 840
attctatt_{ttc} aaggag_{acag} tcataat_{gaa} atacctat_{tg} cctacgg_{cag} ccgctg_{gatt} 900
gttattact_c gctgccc_{aac} cagcga_{tggc} gcaccat_{cat} caccatc_{acg} atatcc_{agat} 960
gacc_{cag}tc_c ccg_{tcc}tc_{ccc} tgag_{tgc}tt_c t_gtt_ggt_{gac} c_gt_gtt_{acca} tcac_{ctg}cc_g 1020
ttocac_{caaa} tccct_{cctgc} actcca_{acgg} tatcac_{ctac} ctttatt_{gg}t atcaac_{agaa} 1080
accggg_{taaa} gctccg_{aaac} ttctg_{atcta} ccagat_{gtcc} aacct_{ggctt} ccgg_{tgttc} 1140
gtctog_{tttc} tccag_{ttctg} gttct_{ggtac} cga_{ctt}c_{acc} ctg_{acc}at_{ct} cttct_{ctgca} 1200
gccgga_{agac} ttcg_{ctac}ct actact_ggc_c tcaga_{acctg} gaaat_{cccgc} gtac_{ctt}cg_g 1260
tcagg_{gtacc} aaag_{ttga}c ttaag_{cgcac} t_gt_gg_{ctgca} ccat_{ctgtct} tc_{atctt}ccc 1320
gccat_{ctgat} gagc_{agttga} aatct_{gga}c t_gc_{ctctgtt} g_tg_{tgc}ct_{gc} tga_{ata}act_t 1380
ctatccc_{aga} gagg_{ccaa}ag tacag_{tggaa} ggtg_{gata}ac gcc_{ctcca}at cggg_taa_{ctc} 1440
ccagg_{agagt} gtcac_{agagc} aggac_{agcaa} ggac_{agcacc} tacag_{cc}tca gcag_{cacc}ct 1500
gacg_{ctgagc} aaag_{cagact} acgag_{aaaca} caaag_{tctac} g_{cctg}g_{gaag} tcac_{ccatca} 1560
ggg_{cctgagc} t_{cgccc}gt_{ca} caaag_{agctt} caac_{agggga} gag_{tgttagt} ag_{ctcgag} 1618

<210> 18
<211> 488
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> VB5-845

10

<400> 18

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly
20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35 40 45

ES 2 424 643 T3

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly
 50 55 60

Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser
 65 70 75 80

Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr
 85 90 95

Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala Ile Lys Gly Asp Tyr Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240

Cys Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu
 245 250 255

Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala His His His His His Asp Ile Gln
 260 265 270

Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val
 275 280 285

ES 2 424 643 T3

Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile
 290 295 300
 Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 305 310 315 320
 Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 325 330 335
 Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 340 345 350
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile
 355 360 365
 Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Thr Val
 370 375 380
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 385 390 395 400
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 405 410 415
 Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 420 425 430
 Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 435 440 445
 Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 450 455 460
 Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 465 470 475 480
 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 485

<210> 19
 <211> 2404
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VB6-845-CL-de-bouganina

<400> 19

5

10

ES 2 424 643 T3

gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag 60
 tcataatgaa atacctattg cctacggcag ccgctggatt gttattactc gctgccaac 120
 cagcgatggc gcaccatcat caccatcacg aagtacagct ggttcagtcc ggcccgggtc 180
 ttgttcaacc gggtggttcc gttcgtatct cttgcgctgc ttctggttac acgttcacca 240
 actacggcat gaactgggtc aaacaggctc cgggtaaagg cctggaatgg atgggctgga 300
 tcaacaceta caccggtgaa tccacctacg ctgactcctt caaaggtegc ttcactttct 360
 ccctcgacac aagtgctagt gctgcatacc tccaaatcaa ctcgctcgtg gcagaggata 420
 cagcagtcta ttactcgcgc cgtttcgcta tcaaagggtga ctactggggg caaggcacgc 480
 tgctgaccgt ttctcggct agcaccaaaag gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct 540
 ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg 600
 aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccg 660
 ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca 720
 gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg 780
 acaagaaagt tgagccaaa tcttggtagt gatctagagt cgacctgcag gtctatggaa 840
 cgataaatgc ccatgaaaat tctatttcaa ggagacagtc ataatgaaat acctattgcc 900
 tacggcagcc gctggattgt tattactcgc tgcccaacca gcgatggcgg atatccagat 960
 gaccagtc ccgtctccc tgagtgttc tgttgggtgac cgtgttacca tcacctgcc 1020
 ttccacaaa tccctcctgc actccaacgg tatcacctac ctttattggt atcaacagaa 1080
 accgggtaaa gctccgaaac ttctgatcta ccagatgtcc aacctggctt ccggtgttcc 1140
 gtctcgtttc tccagttctg gttctggtac cgacttcacc ctgaccatct ettctctgca 1200
 gccggaagac ttcgctacct actactcgc tcagaacctg gaaatcccgc gtacctcgg 1260
 tcagggtacc aaagttgaac ttaagcgcac tgtggctgca ccatctgtct tcatctccc 1320
 gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctggt gtgtgcctgc tgaataactt 1380
 ctatcccaga gaggccaaag tacagtgga ggtggataac gccctccaat cgggtaactc 1440
 ccaggagagt gtcacagagc aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagaccct 1500
 gacgctgagc aaagcagact acgagaaaca caaagtctac gcctggaag tcacccatca 1560
 gggcctgagc tcgcccgtca caaagagctt caacagggga gagtgtagca ggcacaggca 1620
 gccagaggc tgggagcagc tctacaacac cgtgtcattt aaccttgag aagcttatga 1680
 gtaccccact ttatacaag atttgcgcaa tgaattggct aagggcacac cagtatgtca 1740
 acttccagtg acactacaaa ccatagccga tgacaagcga tttgttctag ttgatatcac 1800
 tacgacctcg aagaaaacag ttaaggttgc tatagatgtg acagatgtgt atgttgtggg 1860

ES 2 424 643 T3

ttatcaagac aaatgggatg gcaaagatcg agctgttttc cttgacaagg ttctactgt 1920
 tgcaactagt aaacttttcc caggggtgac taatcgtgta acgttaacat ttgatggcag 1980
 ctatcagaaa cttgtgaatg ctgccaaagc tgatagaaag gctctcgaac tgggggttaa 2040
 caaattggaa ttttccattg aagcaatcca tggtaaaacg ataaatggtc aagaggcagc 2100
 caagttcttt cttattgtca tccaaatggt ttcagaggca gctcggttca aatatattga 2160
 gactgaggtg gttgatagag gattatatgg atcattcaaa cctaatttta aagtattgaa 2220
 cttggagaac aattggggcg acatctctga tgccattcac aaatcatccc cacaatgtac 2280
 cactattaat cgggcacttc agttgataag cccctcaaat gacccatggg ttgtaaataa 2340
 agtgagtcaa attagtcccc atatgggtat ccttaagttt aaaagctcca aatagtagct 2400
 cgag 2404

<210> 20
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VB6-845-CL-de-bouganina

<400> 20

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala His His His His His His Glu Val Gln Leu
 20 25 30

Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile
 35 40 45

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
 50 55 60

Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn
 65 70 75 80

Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe
 85 90 95

Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn
 100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala

ES 2 424 643 T3

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

ES 2 424 643 T3

Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Leu Lys Arg Thr Val
 370 375 380

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 385 390 395 400

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
 405 410 415

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
 420 425 430

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
 435 440 445

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
 450 455 460

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 465 470 475 480

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly
 485 490 495

Trp Glu Gln Leu Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr
 500 505 510

Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly
 515 520 525

Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp
 530 535 540

Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val
 545 550 555 560

Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp
 565 570 575

Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr
 580 585 590

Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu
 595 600 605

ES 2 424 643 T3

Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp
 610 615 620

Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu
 625 630 635 640

Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe
 645 650 655

Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile
 660 665 670

Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn
 675 680 685

Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala
 690 695 700

Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln
 705 710 715 720

Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln
 725 730 735

Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
 740 745 750

<210> 21
 <211> 2404
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VB6-845-NVH-de-bouganina

<400> 21

gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag 60
 tcataatgaa atacctattg cctaeggcag ccgctggatt gttattactc gctgccaac 120
 cagcgatggc gtacaacacc gtgtcattta accttggaga agcttatgag taccctactt 180
 ttatacaaga tttgcgcâat gaattggcta agggcacacc agtatgtcaa cttccagtga 240
 cactacaaac catagccgat gacaagcgat ttgttctagt tgatatactc acgacctcga 300
 agaaaacagt taaggttgct atagatgtga cagatgtgta tgttgtgggt tatcaagaca 360
 aatgggatgg caaagatcga gctgttttcc ttgacaaggt tcctactggt gcaactagta 420
 aacttttccc aggggtgact aatcgtgtaa cgtaacatt tgatggcagc tatcagaaac 480

ES 2 424 643 T3

ttgtgaatgc tgccaaagct gatagaaagg ctctcgaact gggggttaac aaattggaat 540
 ttccattga agcaatccat ggtaaaacga taaatgggtca agaggcagcc aagttctttc 600
 ttattgtcat ccaaatgggt tcagaggcag ctcggttcaa atatattgag actgaggtgg 660
 ttgatagagg attatatgga tcattcaaac ctaattttaa agtattgaac ttggagaaca 720
 attggggoga catctctgat gccattcaca aatcatcccc acaatgtacc actattaate 780
 cggcacttca gttgataage ccctcaaagc acccatgggt tgtaaataaa gtgagtcaaa 840
 ttagtcccga tatgggtatc ctttaagttta aaagctccaa aaccaggcac aggcagccca 900
 gaggtggga gcagctcgaa gtacagctgg ttcagtcgg cccgggtctt gttcaaccgg 960
 gtggttccgt tcgtatctct tgcgctgctt ctggttacac gttcaccaac tacggcatga 1020
 actgggtcaa acaggctcgc ggtaaaggcc tggaatggat gggctggatc aacacctaca 1080
 cgggtgaate cacctacgct gactccttca aaggctgctt cactttctcc ctcgacacaa 1140
 gtgctagtgc tgcatacctc caaatcaact cgctgcgtgc agaggataca gcagtctatt 1200
 actgcgcccg tttegtatc aaaggtgact actggggta aggcaagctg ctgaccgttt 1260
 ccteggttag caccaaaggc ccatcggtct tccccctgga accctctcc aagagcacct 1320
 ctgggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa cgggtgacgg 1380
 tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggct gtcctacagt 1440
 cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc 1500
 agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtgt 1560
 agcccaaate ttgttagtga tctagagtcg acctgcaggt ctatggaacg ataaatgccc 1620
 atgaaaatte tatttcaagg agacagtcac aatgaaatac ctattgccta cggcagccgc 1680
 tggattgtta ttactcgtg cccaaccagc gatggcgcac catcatcacc atcacgatat 1740
 ccagatgacc cagtccccgt cctccctgag tgcttctgtt ggtgaccgtg ttaccateac 1800
 ctgocgttc accaaatccc tctgcactc caacggtatc acctaccttt attggtatca 1860
 acagaaaccg ggtaaagctc cgaaacttct gatctaccag atgtccaacc tggttccgg 1920
 tgttccgtct cgtttctcca gttctgggtc tggtaaccgac ttcacctga ccactcttc 1980
 tctgcagccg gaagacttcg ctacctacta ctgcgctcag aacctggaaa tcccgcgtac 2040
 cttcggtcag ggtaccaaag ttgaacttaa gcgcactgtg gctgcaccat ctgtcttcat 2100
 cttcccgcca tctgatgagc agttgaaate tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa 2160
 taacttctat ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg 2220
 taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag 2280
 caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac 2340
 ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttagtagct 2400
 cgag 2404

ES 2 424 643 T3

5 <210> 22
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> VB6-845-NVH-de-bouganina
 10 <400> 22

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu
 20 25 30
 Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala
 35 40 45
 Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala
 50 55 60
 Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr
 85 90 95
 Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val
 100 105 110
 Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val
 115 120 125
 Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys
 130 135 140
 Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser
 145 150 155 160
 Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys
 165 170 175

ES 2 424 643 T3

Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys
 180 185 190

Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys
 195 200 205

Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser
 210 215 220

Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala
 225 230 235 240

Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val
 245 250 255

Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
 260 265 270

Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Val Gln Leu
 275 280 285

Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile
 290 295 300

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
 305 310 315 320

Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn
 325 330 335

Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe
 340 345 350

Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn
 355 360 365

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala
 370 375 380

Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
 385 390 395 400

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 405 410 415

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

ES 2 424 643 T3

			420					425					430			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		435					440					445				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	450					455					460					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
465					470					475					480	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
			485						490					495		
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	
			500					505					510			
Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	His	His	His	
		515					520					525				
His	His	His	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	
	530					535					540					
Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Thr	Lys	Ser	Leu	
545					550					555					560	
Leu	His	Ser	Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	
				565					570					575		
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	
			580					585					590			
Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	
		595					600					605				
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	
	610					615					620					
Ala	Gln	Asn	Leu	Glu	Ile	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	
625					630					635					640	
Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	
				645					650					655		
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	
			660					665					670			

ES 2 424 643 T3

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
675 680 685

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
690 695 700

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
705 710 715 720

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
725 730 735

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
740 745 750

<210> 23
<211> 2404
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> VB6-845-NVL-de-bouganina

<400> 23

gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag 60
tcataatgaa atacctattg cctacggcag ccgctggatt gttattactc gctgccaac 120
cagcgatggc gcaccatcat caccatcacg aagtacagct ggttcagtcg ggcccgggtc 180
ttgttcaacc gggtggttcc gttcgtatct cttgcgctgc ttctggttac acgttcacca 240
actacggcat gaactgggtc aaacaggctc cgggtaaagg cctggaatgg atgggctgga 300
tcaacaccta caccggtgaa tccacctacg ctgactcctt caaaggctgc ttcactttct 360
ccctcgacac aagtgctagt gctgcatacc tccaaatcaa ctgctgctgt gcagaggata 420
cagcagteta ttactgcgcc cgtttcgcta tcaaagggtga ctactgggggt caaggcacgc 480
tgctgaccgt ttctcggct agcaccaaag gcccatcggg cttccccctg gcaccctcct 540
ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgctt ggtcaaggac tacttccccg 600
aacgggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg 660
ctgtectaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca 720
gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg 780
acaagaaagt tgagcccaaa tcttgtagt gatctagagt cgacctgcag gtctatggaa 840
cgataaatgc ccatgaaaat tctatttcaa ggagacagtc ataatgaaat acctattgcc 900

ES 2 424 643 T3

tacggcagcc gctggattgt tattactcgc tgcccaacca gcgatggcgt acaacaccgt 960
 gtcatttaac cttggagaag cttatgagta ccccactttt atacaagatt tgcgcaatga 1020
 attggctaag ggcacaccag tatgtcaact tccagtgaca ctacaaacca tagccgatga 1080
 caagcgattt gttctagttg atatcactac gacctcgaag aaaacagtta aggttgctat 1140
 agatgtgaca gatgtgtatg ttgtgggtta tcaagacaaa tgggatggca aagatcgagc 1200
 tgttttccct gacaagggtc ctactgttgc aactagtaaa cttttcccag ggggtgactaa 1260
 tcgtgtaacg ttaacatttg atggcagcta tcagaaactt gtgaatgctg ccaaagctga 1320
 tagaaaggct ctcgaactgg gggtaacaa attggaattt tccattgaag caatccatgg 1380
 taaaacgata aatggtaag aggcagccaa gttctttctt attgtcatcc aatgggttc 1440
 agaggcagct cggttcaaat atattgagac tgagggtggt gatagaggat tatatggatc 1500
 attcaaacct aattttaag tattgaactt ggagaacaat tggggcgaca tctctgatgc 1560
 cattcacaaa tcatccccac aatgtaccac tattaatccg gcacttcagt tgataagccc 1620
 ctcaaatgac ccatgggttg taaataaagt gagtcaaatt agtcccgata tgggtatcct 1680
 taagttaaaa agctccaaaa ccaggcacag gcagcccaga ggctgggagc agctcgatat 1740
 ccagatgacc cagtccccgt cctccctgag tgcttctggt ggtgaccgtg ttaccatcac 1800
 ctgccgttcc accaaatccc tcttgcactc caacggatc acctacctt attggtatca 1860
 acagaaaccg ggtaaagctc cgaaacttct gatctaccag atgtccaacc tggcttccgg 1920
 tgttcctctc cgtttctcca gttctgggtc tggatccgac ttcacctga ccatctcttc 1980
 tctgcagccg gaagacttcg ctacctacta ctgcgctcag aacctggaaa tcccgcgtac 2040
 ctteggctcag ggtaccaaag ttgaacttaa gcgcactgtg gctgcacat ctgtcttcat 2100
 ctcccccca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa 2160
 taactcttat ccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg 2220
 taactcccag gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag 2280
 caccctgacg ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac 2340
 ccatcagggc ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttagtagct 2400
 cgag 2404

<210> 24
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VB6-845-NVL-de-bouganina

10

<400> 24

ES 2 424 643 T3

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala His His His His His His Glu Val Gln Leu
20 25 30

Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile
35 40 45

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp
50 55 60

Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn
65 70 75 80

Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Phe Lys Gly Arg Phe
85 90 95

Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser Ala Ala Tyr Leu Gln Ile Asn
100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Phe Ala
115 120 125

Ile Lys Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Leu Thr Val Ser Ser
130 135 140

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
165 170 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
180 185 190

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
195 200 205

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
210 215 220

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
225 230 235 240

ES 2 424 643 T3

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala
 245 250 255
 Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Tyr Asn Thr
 260 265 270
 Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln
 275 280 285
 Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro
 290 295 300
 Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp
 305 310 315 320
 Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr
 325 330 335
 Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg
 340 345 350
 Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe
 355 360 365
 Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln
 370 375 380
 Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile
 405 410 415
 Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val
 420 425 430
 Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg
 435 440 445
 Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu
 450 455 460
 Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln
 465 470 475 480

ES 2 424 643 T3

Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp
 485 490 495
 Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile
 500 505 510
 Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
 515 520 525
 Glu Gln Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 530 535 540
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu
 545 550 555 560
 Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 565 570 575
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser
 580 585 590
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 595 600 605
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 610 615 620
 Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 625 630 635 640
 Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 645 650 655
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 660 665 670
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 675 680 685
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 690 695 700
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 705 710 715 720
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

ES 2 424 643 T3

725

730

735

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
740 745 750

5 <210> 25
<211> 2407
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> VB6-845-gelonina

<400> 25

```

gaattcctgc aggtctatgg aacgataaat gcccatgaaa attctatttc aaggagacag      60
tcataatgaa atacctattg cctacggcag cgcctggatt gttattactc gctgcecaac    120
cagcgatggc ggaagtacag ctggttcagt cgggccggg tcttgttcaa ccgggtggtt    180
ccgttcgtat ctcttgcgct gcttctggtt acacgttcac caactacggc atgaactggg    240
tcaaacaggc tccgggtaaa ggccctggaat ggatgggctg gatcaacacc tacaccggtg    300
aatccaccta cgctgactcc ttcaaaggtc gcttcacttt ctcctcgcac acaagtgcta    360
gtgctgcata cctccaaatc aactcgctgc gtgcagagga tacagcagtc tattactgcg    420
cccgtttegc tatcaaaggt gactactggg gtcaaggcac gctgctgacc gtttctcggg    480
ctagcaccaa aggeccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg    540
gcacagcggc cctgggctgc ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acgggtgctgt    600
ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtccctcag    660
gactctaetc cctcagcagc gtgggtgaccg tgcctccag cagcttgggc acccagacct    720
acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaagggt ggacaagaaa gttgagccca    780
aatcttgtag caggcacagg cagcccagag gctgggagca gctcggcctg gacaccgtga    840
gctttagcac taaagggtcc acttatatta cctacgtgaa tttcttgaat gagctacgag    900
ttaaattgaa acccgaaggt aacagccatg gaatccatt gctgcgcaaa aaatgtgatg    960
atcctggaaa gtgtttcgtt ttggtagcgc tttcaaatga caatggacag ttggcggaaa   1020
tagctataga tgttacaagt gtttatgtgg tgggctatca agtaagaaac agatcttact   1080
tctttaaaga tgctccagat gctgcttacg aaggcctctt caaaaacaca attaaaacaa   1140
gacttcattt tggcggcagc tatccctcgc tgggaaggatga gaaggcatat agagagacaa   1200
cagacttggg cattgaacca ttaaggattg gcatcaagaa acttgatgaa aatgcatag   1260
acaattataa accaacggag atagctagtt ctctattggt tgttattcaa atgggtgctg   1320
aagcagctcg attcaccttt attgagaacc aaattagaaa taactttcaa cagagaatcc   1380

```

gcccgacgaa taatacaatc agccttgaga ataaatgggg taaactctcg ttccagatcc 1440
 ggacatcagg tgcaaatgga atgttttcgg aggcagttga attggaacgt gcaaatggca 1500
 aaaaatacta tgtcaccgca gttgatcaag taaaacccaa aatagcactc ttgaagttcg 1560
 tcgataaaga tcctaaatag tgatctagag tcgacctgca ggtctatgga acgataaatg 1620
 cccatgaaaa ttctatttca aggagacagt cataatgaaa tacctattgc ctacggcagc 1680
 cgctggattg ttattactcg ctgcccacc agcgatggcg caccatcacc accatcacga 1740
 tatccagatg acccagtccc cgctctccct gagtgttct gttggtgacc gtgttaccat 1800
 cacctgccgt tccaccaaat ccctcctgca ctccaacggt atcacctacc tttattggta 1860
 tcaacagaaa cgggtaag ctccgaaact tctgatctac cagatgtcca acctggcttc 1920
 cgggtgttccg tctcgtttct ccagttctgg ttctggtacc gacttcaccc tgaccatctc 1980
 ttctctgcag ccggaagact tcgctaccta ctactgcgct cagaacctgg aaatcccgcg 2040
 taccttcggt cagggtacca aagttgaact taagcgcact gtggetgcac catctgtctt 2100
 catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct 2160
 gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc 2220
 gggtaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag 2280
 cagcacctg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt 2340
 cacccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttagta 2400
 gctcgag 2407

<210> 26
 <211> 751
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VB6-845-gelonina

<400> 26

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly
 20 25 30

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Val Arg Ile Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45

Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly

5

10

ES 2 424 643 T3

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

ES 2 424 643 T3

Val Leu Val Ala Leu Ser Asn Asp Asn Gly Gln Leu Ala Glu Ile Ala
 305 310 315 320
 Ile Asp Val Thr Ser Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Val Arg Asn Arg
 325 330 335
 Ser Tyr Phe Phe Lys Asp Ala Pro Asp Ala Ala Tyr Glu Gly Leu Phe
 340 345 350
 Lys Asn Thr Ile Lys Thr Arg Leu His Phe Gly Gly Ser Tyr Pro Ser
 355 360 365
 Leu Glu Gly Glu Lys Ala Tyr Arg Glu Thr Thr Asp Leu Gly Ile Glu
 370 375 380
 Pro Leu Arg Ile Gly Ile Lys Lys Leu Asp Glu Asn Ala Ile Asp Asn
 385 390 395 400
 Tyr Lys Pro Thr Glu Ile Ala Ser Ser Leu Leu Val Val Ile Gln Met
 405 410 415
 Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Thr Phe Ile Glu Asn Gln Ile Arg Asn
 420 425 430
 Asn Phe Gln Gln Arg Ile Arg Pro Thr Asn Asn Thr Ile Ser Leu Glu
 435 440 445
 Asn Lys Trp Gly Lys Leu Ser Phe Gln Ile Arg Thr Ser Gly Ala Asn
 450 455 460
 Gly Met Phe Ser Glu Ala Val Glu Leu Glu Arg Ala Asn Gly Lys Lys
 465 470 475 480
 Tyr Tyr Val Thr Ala Val Asp Gln Val Lys Pro Lys Ile Ala Leu Leu
 485 490 495
 Lys Phe Val Asp Lys Asp Pro Lys Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala
 500 505 510
 Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala His His
 515 520 525
 His His His His Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 530 535 540

ES 2 424 643 T3

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Thr Lys Ser
 545 550 555 560

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys
 565 570 575

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala
 580 585 590

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 595 600 605

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 610 615 620

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 625 630 635 640

Val Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 645 650 655

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 660 665 670

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 675 680 685

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 690 695 700

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 705 710 715 720

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 725 730 735

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 740 745 750

<210> 27
 <211> 2431
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> VB6-011

10

<400> 27

ES 2 424 643 T3

gaattcctgc	aggctctatgg	aacgataaat	gccccatgaaa	attctatttc	aaggagacag	6 0
tcataatgaa	atacctattg	cctacggcag	ccgctggatt	gttattactc	gctgccccaac	12 0
cagcgatggc	gcaggtgcag	ctgggtggagt	ctggggggagg	cgtgggtccag	cctggggaggt	18 0
ccctgagact	ctcctgtgca	gcctctggat	tccccctcag	aagctttgct	atgcactggg	24 0
tccgccaggc	tctaggcaag	gggctggagt	gggtggcagt	tatatcatat	gatggaagca	30 0
ctaaatacta	cgcagactcc	gtgaagggcc	gattcaccat	ctccagagac	acttccaaga	36 0
acacggtgta	tctaaaaatg	aacagcctga	gaactgagga	cacggctgtc	tattactgtg	42 0
cgagagatca	gagcctgttg	ggtgactatg	accactacta	cggtttgac	gtctggggca	48 0
aagggaccac	ggtcacggtc	tcttcagcta	gcaccaaagg	cccatcggtc	ttccccctgg	54 0
caccctctc	caagagcacc	tctgggggca	cagcggccct	gggctgcctg	gtcaaggact	60 0
acttccccga	accggtgacg	gtgtcgtgga	actcaggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	66 0
ccttccccgc	tgtcctacag	tcctcaggac	tctactcct	cagcagcgtg	gtgaccgtgc	72 0
cctccagcag	cttgggcacc	cagacctaca	tctgcaacgt	gaatcacaag	cccagcaaca	78 0
ccaagtgga	caagaaagt	gagcccaat	cttgtaccag	gcacaggcag	cccagaggct	84 0
gggagcagct	ctacaacacc	gtgtcattta	accttgaga	agcttatgag	taccctactt	90 0
ttatacaaga	tttgcgcaat	gaattggcta	agggcacacc	agtatgtcaa	cttccagtga	96 0
cactacaaac	catagccgat	gacaagcgat	ttgttctagt	tgatatcact	acgacctcga	102 0
agaaaacagt	taaggttget	atagatgtga	cagatgtgta	tgttgtgggt	tatcaagaca	108 0
aatgggatgg	caaagatcga	gctgttttcc	ttgacaaggt	tcctactgtt	gcaactagta	114 0
aacttttccc	aggggtgact	aatcgtgtaa	cgttaacatt	tgatggcagc	tatcagaaac	120 0
ttgtgaatgc	tgccaaagct	gatagaaagg	ctctcgaact	gggggttaac	aaattggaat	126 0
tttccattga	agcaatccat	ggtaaaacga	taaatggcca	agaggcagcc	aagttctttc	132 0
ttattgtcat	ccaaatgggt	tcagaggcag	ctcggttcaa	atataattgag	actgaggtgg	138 0
ttgatagagg	attatatgga	tcattcaaac	ctaatttta	agtattgaac	ttggagaaca	144 0
attggggcga	catctctgat	gccattcaca	aatcatcccc	acaatgtacc	actattaatc	150 0
cggcacttca	gttgataagc	ccctcaaatg	acctatgggt	tgtaaaataa	gtgagtcaaa	156 0
ttagtcccga	tatgggtatc	cttaagttta	aaagctccaa	atagtgatct	agagtcgacc	162 0
tgcaggtcta	tggaacgata	aatgcccattg	aaaattctat	ttcaaggaga	cagtcataat	168 0
gaaataccta	ttgcctacgg	cagccgctgg	attgttatta	ctcgtgccc	aaccagcgat	174 0
ggcgcacac	catcaccatc	acgatatcgt	gttgacgcag	tctccaggca	ccctgtcttt	180 0

ES 2 424 643 T3

```

gtctccaggg gaaagagcca ccctctcctg cagggccagt cagagtgtta gtagcagcta 1860
cttagcctgg taccagcaga aacctggcca ggctcccagg ctctcatct atgggtgcatc 1920
caccagggcc actggcatgc cagacagggt cagtggcagt gggtcggga cagacttcac 1980
tctcaccatc agtagactgg agcctgaaga ttttgcagtg tattactgtc agcagtatgg 2040
tagctcacct cagacacctc agatcacttt cggcggaggg accaaggtgg agatcaaacg 2100
aactgtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg 2160
aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg 2220
gaaggtggat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 2280
caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag actacgagaa 2340
acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacceca tcagggcctg agctcgcccg tcacaaagag 2400
cttcaacagg ggagagtgtt agtgactcga g 2431

```

<210> 28
 <211> 759
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> VB6-011

<400> 28

```

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
1           5           10           15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
20           25           30

Val Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
35           40           45

Phe Pro Phe Arg Ser Phe Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Leu Gly
50           55           60

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Thr Lys
65           70           75           80

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr
85           90           95

Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Lys Met Asn Ser Leu Arg Thr Glu Asp
100          105          110

```

ES 2 424 643 T3

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

Asp His Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr
130 135 140

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
165 170 175

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
180 185 190

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
195 200 205

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
210 215 220

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Thr Arg His Arg Gln Pro
245 250 255

Arg Gly Trp Glu Gln Leu Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu
260 265 270

Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala
275 280 285

Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala
290 295 300

Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys
305 310 315 320

Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr
325 330 335

Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val
340 345 350

Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val

ES 2 424 643 T3

355		360		365											
Thr	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Ser	Tyr	Gln	Lys	Leu	Val	Asn	Ala	Ala	Lys
	370					375						380			
Ala	Asp	Arg	Lys	Ala	Leu	Glu	Leu	Gly	Val	Asn	Lys	Leu	Glu	Phe	Ser
385					390					395					400
Ile	Glu	Ala	Ile	His	Gly	Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Gln	Glu	Ala	Ala	Lys
				405					410					415	
Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Ile	Gln	Met	Val	Ser	Glu	Ala	Ala	Arg	Phe	Lys
			420					425					430		
Tyr	Ile	Glu	Thr	Glu	Val	Val	Asp	Arg	Gly	Leu	Tyr	Gly	Ser	Phe	Lys
		435					440					445			
Pro	Asn	Phe	Lys	Val	Leu	Asn	Leu	Glu	Asn	Asn	Trp	Gly	Asp	Ile	Ser
	450					455						460			
Asp	Ala	Ile	His	Lys	Ser	Ser	Pro	Gln	Cys	Thr	Thr	Ile	Asn	Pro	Ala
465					470					475					480
Leu	Gln	Leu	Ile	Ser	Pro	Ser	Asn	Asp	Pro	Trp	Val	Val	Asn	Lys	Val
				485					490					495	
Ser	Gln	Ile	Ser	Pro	Asp	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	Phe	Lys	Ser	Ser	Lys
			500					505					510		
Met	Lys	Tyr	Leu	Leu	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala
		515					520					525			
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	His	His	His	His	His	His	Asp	Ile	Val	Leu
	530					535						540			
Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr
545					550					555					560
Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp
				565					570					575	
Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala
			580					585					590		
Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Met	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
		595					600					605			

ES 2 424 643 T3

Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe
610 615 620

Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Thr Pro Gln
625 630 635 640

Ile Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
645 650 655

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
660 665 670

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
675 680 685

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
690 695 700

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
705 710 715 720

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
725 730 735

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
740 745 750

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
755

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

<400> 29

Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu
1 5 10 15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

<400> 30

Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly

1 5 10 15

ES 2 424 643 T3

<212> PRT
<213> Bougainvillea spectabilis

5 <400> 37

Thr Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro
1 5 10 15

<210> 38
<211> 15
<212> PRT
<213> Bougainvillea spectabilis

10

<400> 38

Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln
1 5 10 15

15

<210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> Bougainvillea spectabilis

20

<400> 39

Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val
1 5 10 15

25

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> Bougainvillea spectabilis

30

<400> 40

Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln
1 5 10 15

35

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Bougainvillea spectabilis

40

<400> 41

Gly Thr Pro Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala
1 5 10 15

45

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Bougainvillea spectabilis

50

<400> 42

Val Cys Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys
1 5 10 15

55

<210> 43
<211> 15

ES 2 424 643 T3

<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

<400> 43

5

Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
1 5 10 15

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

10

<400> 44

Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp
1 5 10 15

15

<210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

20

<400> 45

Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr
1 5 10 15

25

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

30

<400> 46

Asp Asp Lys Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys
1 5 10 15

35

<210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

40

<400> 47

Arg Phe Val Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val
1 5 10 15

45

<210> 48
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

50

<400> 48

Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala
1 5 10 15

55

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> *Bougainvillea spectabilis*

ES 2 424 643 T3

<400> 49

Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val
 1 5 10 15

5

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

10

<400> 50

Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val
 1 5 10 15

15

<210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

20

<400> 51

Lys Thr Val Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val
 1 5 10 15

25

<210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

30

<400> 52

Lys Val Ala Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln
 1 5 10 15

35

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 53

Ile Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp
 1 5 10 15

40

<210> 54

45

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 54

Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys
 1 5 10 15

50

55

<210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

ES 2 424 643 T3

<400> 55

Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala
1 5 10 15

5

<210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

10

<400> 56

Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu
1 5 10 15

15

<210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

20

<400> 57

Asp Lys Trp Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val
1 5 10 15

25

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

30

<400> 58

Asp Gly Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val
1 5 10 15

35

<210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

40

<400> 59

Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
1 5 10 15

45

<210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

50

<400> 60

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

55

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

ES 2 424 643 T3

<400> 61

Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val
 1 5 10 15

5

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

10

<400> 62

Pro Thr Val Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg
 1 5 10 15

15

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

20

<400> 63

Ala Thr Ser Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu
 1 5 10 15

25

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 64

30

Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp
 1 5 10 15

35

<210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 65

40

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

45

<210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 66

50

Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu
 1 5 10 15

55

<210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 67

ES 2 424 643 T3

Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala
 1 5 10 15

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 68

Thr Phe Asp Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Val
 1 5 10 15

<210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 69

Gly Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Val Asp Arg Lys
 1 5 10 15

<210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 70

Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu
 1 5 10 15

<210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 71

Val Asn Ala Ala Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val
 1 5 10 15

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 72

Ala Lys Val Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Tyr Lys Leu
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 73

ES 2 424 643 T3

Asp Arg Lys Asp Leu Glu Leu Gly Val Tyr Lys Leu Glu Phe Ser
 1 5 10 15

<210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 74

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

<210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 75

Leu Gly Val Tyr Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
 1 5 10 15

<210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 76

Tyr Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile
 1 5 10 15

<210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 77

Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln
 1 5 10 15

<210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 78

Ile Glu Ala Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala
 1 5 10 15

<210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 79

ES 2 424 643 T3

Ile His Gly Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala Lys Phe Phe
1 5 10 15

5 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 80

Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ile Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val
1 5 10 15

10 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 81

Asn Gly Gln Glu Ile Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met
1 5 10 15

20 <210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 82

Glu Ile Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu
1 5 10 15

30 <210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 35 <400> 83

Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg
1 5 10 15

40 <210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 45 <400> 84

Leu Ile Val Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr
1 5 10 15

50 <210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 85

ES 2 424 643 T3

Ile Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr
 1 5 10 15

<210> 86
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 86

Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val
 1 5 10 15

<210> 87
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 87

Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 88
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 88

Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly
 1 5 10 15

<210> 89
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 89

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

<210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 90

Glu Val Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe
 1 5 10 15

<210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 91

ES 2 424 643 T3

Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu

1 5 10 15

5
 <210> 92
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 92

Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu
 1 5 10 15

10
 <210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 93

Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp
 1 5 10 15

20
 <210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 94

Pro Asn Phe Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile
 1 5 10 15

30
 <210> 95
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 95

Lys Val Leu Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala
 1 5 10 15

40
 <210> 96
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 96

Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys
 1 5 10 15

50
 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea spectabilis
 <400> 97

ES 2 424 643 T3

Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro
 1 5 10 15

5 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillæa *spectabilis*
 <400> 98

10 Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr
 1 5 10 15

15 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 99

20 Ser Asp Ala Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn
 1 5 10 15

25 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 100

30 Ile His Lys Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu
 1 5 10 15

35 <210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 101

40 Ser Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile
 1 5 10 15

45 <210> 102
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 102

50 Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser
 1 5 10 15

55 <210> 103
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*
 <400> 103

ES 2 424 643 T3

Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Prc
1 5 10 15

5 <210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

10 <400> 104

Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val
1 5 10 15

15 <210> 105
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

20 <400> 105

Gln Leu Ile Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val
1 5 10 15

25 <210> 106
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

30 <400> 106

Ser Pro Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile
1 5 10 15

35 <210> 107
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

40 <400> 107

Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
1 5 10 15

45 <210> 108
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

50 <400> 108

Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile
1 5 10 15

55 <210> 109
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*

<400> 109

ES 2 424 643 T3

Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe
1 5 10 15

5 <210> 110
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 110

Ser Gln Ile Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser
1 5 10 15

10 <210> 111
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 111

Ser Pro Asp Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys Leu Thr
1 5 10 15

20 <210> 112
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 112

Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys Leu Thr Gln Phe Ala
1 5 10 15

30 <210> 113
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 113

Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys Leu Thr Gln Phe Ala Thr Met Ile
1 5 10 15

35 <210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 114

Lys Ser Ser Lys Leu Thr Gln Phe Ala Thr Met Ile Arg Ser Ala
1 5 10 15

45 <210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Bougainvillea spectabilis*
 <400> 115

50
 55

ES 2 424 643 T3

Lys Leu Thr Gln Phe Ala Thr Met Ile Arg Ser Ala Ile Val Glu
 1 5 10 15

5 <210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 116

Gln Phe Ala Thr Met Ile Arg Ser Ala Ile Val Glu Asp Leu Asp
 1 5 10 15

10 <210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

15 <400> 117

Thr Met Ile Arg Ser Ala Ile Val Glu Asp Leu Asp Gly Asp Glu
 1 5 10 15

20 <210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

25 <400> 118

Arg Ser Ala Ile Val Glu Asp Leu Asp Gly Asp Glu Leu Glu Ile
 1 5 10 15

30 <210> 119
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

35 <400> 119

Ile Val Glu Asp Leu Asp Gly Asp Glu Leu Glu Ile Leu Glu Pro
 1 5 10 15

40 <210> 120
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bougainvillea *spectabilis*

45 <400> 120

Asp Leu Asp Gly Asp Glu Leu Glu Ile Leu Glu Pro Asn Ile Ala
 1 5 10 15

50 <210> 121
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador OL1032

<400> 121

ES 2 424 643 T3

cattacaaac gtctaccaag ttt 23
 <210> 122
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Cebador OL1033
 <400> 122
 ttacaaaagt agataagtaa tgtg 24
 15 <210> 123
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador OL1322
 <400> 123
 25 gatatacata tgaaatacct atgcctacg 30
 <210> 124
 <211> 36
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador OL1067
 35 <400> 124
 tgacacagtg ttgtacgctg gttgggcagc gagtaa 36
 <210> 125
 <211> 36
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador OL1068
 45 <400> 125
 gctgcccaac cagcgtacaa cactgtgtca ttaac 36
 <210> 126
 <211> 35
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador OL1323
 <400> 126
 cgagtgccgc cgctcaatgg tgatggtgat ggtgt 35
 <210> 127
 <211> 13
 60 <212> PRT
 <213> Virus de la gripe
 65 <400> 127

ES 2 424 643 T3

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
1 5 10

5
<210> 128
<211> 15
<212> PRT
<213> Chlamydia sp.

<400> 128

Lys Val Val Asp Gln Ile Lys Lys Ile Ser Lys Pro Val Gln His
1 5 10 15

10
15
<210> 129
<211> 250
<212> PRT
<213> Bougainvillea *spectabilis*

<400> 129

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
1 5 10 15

ES 2 424 643 T3

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

REIVINDICACIONES

5 1. Una proteína bouganina modificada en donde dicha bouganina modificada tiene una propensión reducida para activar una respuesta inmunitaria en comparación con una bouganina no modificada, en donde dicha bouganina tiene una sustitución de aminoácidos de uno o más de X¹, X², X³, X⁴ o X⁵ en un epítipo de linfocitos T seleccionado del grupos que consiste en:

- a) AKX¹DRKX²LX³LGVX⁴KL (región epitópica R1, SEC ID N°: 8)
 b) LGVX⁴KLEFSIEAIHG (región epitópica R2, SEC ID N°: 9); y
 c) NGQEX⁵AKFFLIVIQM (región epitópica R3, SEC ID N°: 10) en donde:

10 X¹ es T o A o Q;
 X² es G o A;
 X³ es Q o G;
 X⁴ es N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S; y
 X⁵ es Q o A.

15 2. Una proteína bouganina modificada de la reivindicación 1, en donde la secuencia de aminoácidos de la proteína bouganina modificada comprende:

**YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
 LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT
 SKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKX¹DRKX²LX³LGVX⁴KLEFSIEA
 IHGKTINGQEX⁵AKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVD RGLYGSFKPNF
 KVLNLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNKVSQI
 SPDMGILKFKSSK**

en donde:

20 X¹ es T o A o Q;
 X² es G o A;
 X³ es Q o G;
 X⁴ es N o D o T o A o R o a o E o G o H o K o S; y
 X⁵ es Q o A (SEC ID N°: 12).

3. Una proteína bouganina modificada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que X¹ es A.

4. Una proteína bouganina modificada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que X² es A.

25 5. Una proteína bouganina modificada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que X⁴ es N.

6. Una proteína bouganina modificada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que X⁵ es A.

7. Una proteína bouganina modificada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la bouganina modificada comprende la siguiente secuencia

**YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
 LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT
 SKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKKLEFSIEAIH
 GKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEAAARFKYIETEVD RGLYGSFKPNFKVL
 NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNKVSQISPD
 MGILKFKSSK (SEC ID N°: 13).**

30 8. Una citotoxina que comprende

- (a) un resto diana unido a;
 (b) una proteína bouganina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Una citotoxina que comprende

- (a) un ligando que se une a una célula cancerosa unida a;
- (b) una proteína bouganina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7

5 10. La citotoxina de la reivindicación 9, en la que el ligando es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se une a una célula cancerosa.

11. La citotoxina de la reivindicación 10, en la que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a Ep-CAM en la superficie de la célula cancerosa.

10 12. La citotoxina de la reivindicación 11, en la que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo que se une a Ep-CAM es un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo que se une al dominio extracelular de Ep-CAM-humana y comprende secuencias de la región determinante de la complementariedad derivadas de un anticuerpo MOC-31.

13. La citotoxina de la reivindicación 12, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 16.

14. La citotoxina de la reivindicación 10, en la que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se une a un antígeno asociado a tumor en la superficie de la célula cancerosa.

15. La citotoxina de la reivindicación 14, que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 28.

15 16. Un uso de una citotoxina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 en la fabricación de un medicamento para inhibir o destruir una célula cancerosa.

17. Una citotoxina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 para su uso en la inhibición o la destrucción de una célula cancerosa.

20 18. Un uso de una citotoxina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-15 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

19. Una citotoxina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-15 para su uso en el tratamiento del cáncer.

25 20. El uso de la reivindicación 16 o 18, o la citotoxina para su uso de la reivindicación 17 o 19, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer hepático, cáncer renal, melanomas, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer pulmonar microcítico y no microcítico, sarcomas, gliomas, linfomas de linfocitos T y B.

21. Una composición farmacéutica que comprende la citotoxina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15 y un vehículo diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

30 22. Un procedimiento para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de un animal con cáncer que comprende

- (a) identificar epítomos de linfocitos T de la bouganina;
- (b) modificar uno o más restos de aminoácidos en un epítomo de linfocitos T para preparar una bouganina modificada que tenga una propensión reducida para activar linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7;
- 35 (c) preparar una citotoxina que tenga un ligando de unión a cáncer unido a la bouganina modificada; y
- (d) suspender la citotoxina en un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

40 23. El procedimiento de la reivindicación 22, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer hepático, cáncer renal, melanomas, cáncer gastrointestinal, cáncer de próstata, cáncer pulmonar microcítico y no microcítico, sarcomas, gliomas, linfomas de linfocitos T y B.

24. Una molécula de ácido nucleico que codifica una bouganina modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

25. Una molécula de ácido nucleico que codifica una citotoxina de acuerdo con la reivindicación 8-15.

45 26. Un péptido epítomico de linfocitos T que tiene una propensión reducida para activar una respuesta inmunitaria en comparación con el epítomo de linfocitos T no modificado que comprende una secuencia modificada que comprende: AKX¹DRKX²LX³LGVX⁴KL en la que al menos uno de X¹, X², X³ y X⁴ está modificado desde la secuencia no modificada de las siguiente manera:

- X¹ es T o A o Q;
- X² es G o A;
- 50 X³ es Q o G; y

X⁴ es N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S (SEC ID N°: 8).

27. Un péptido epitópico de linfocitos T que tiene una propensión reducida para activar una respuesta inmunitaria en comparación con el epítipo de linfocitos T no modificado que comprende una secuencia modificada que comprende: LGVX⁴KLEFSIEAIHG

5 en la que X⁴ es N o D o T o A o R o Q o E o G o H o K o S (SEC ID N°: 9).

28. Un péptido epitópico de linfocitos T que tiene una propensión reducida para activar una respuesta inmunitaria en comparación con el epítipo de linfocitos T no modificado que comprende una secuencia modificada que comprende: NGQEX⁵AKFFLIVIQM

en la que X⁵ es Q o A (SEC ID N°: 10).

10 29. Una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido epitópico de linfocitos T de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28.

30. Una proteína bouganina modificada que tiene una propensión reducida para activar una respuesta inmunitaria en comparación con la bouganina no modificada que comprende la secuencia:

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFVLV
DITTTSKKTKVAIDVTDVAVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVATSKLFP
GVTNRVTLTFDGSYQKLVNAAKVDRKDLELGVYKLEFSIEAIHGKTINGQ
EIAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVD RGLYGSFKPNFKVLNLENNWGD I
SDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVNKVSQISPDMGILKFKSSK
[SEC ID N°: 129].

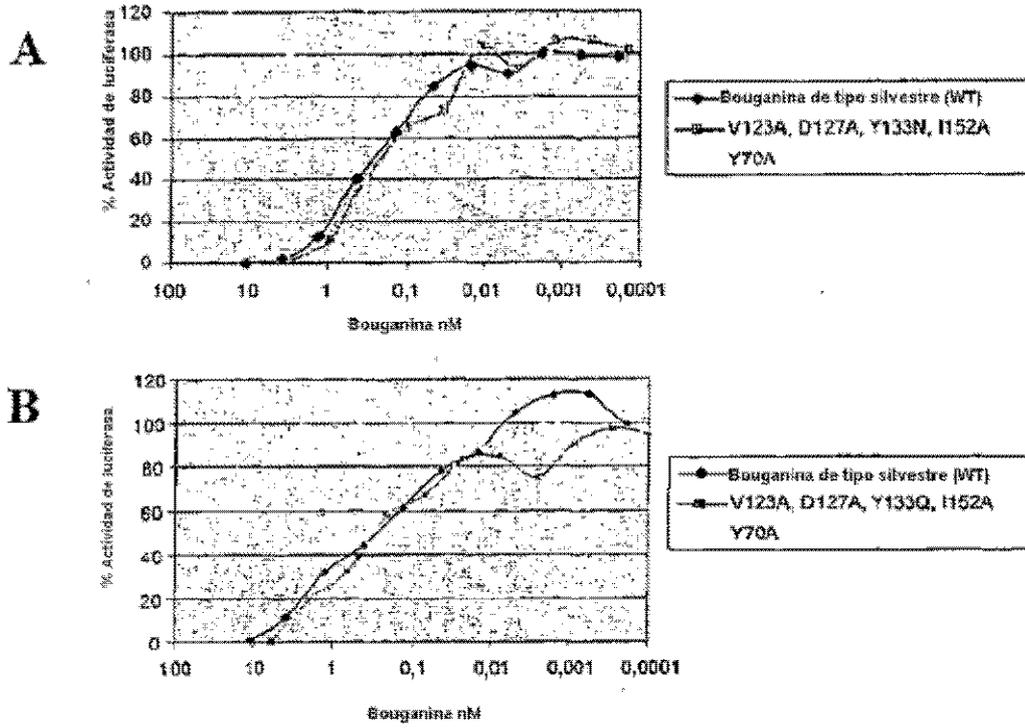


FIGURA 1

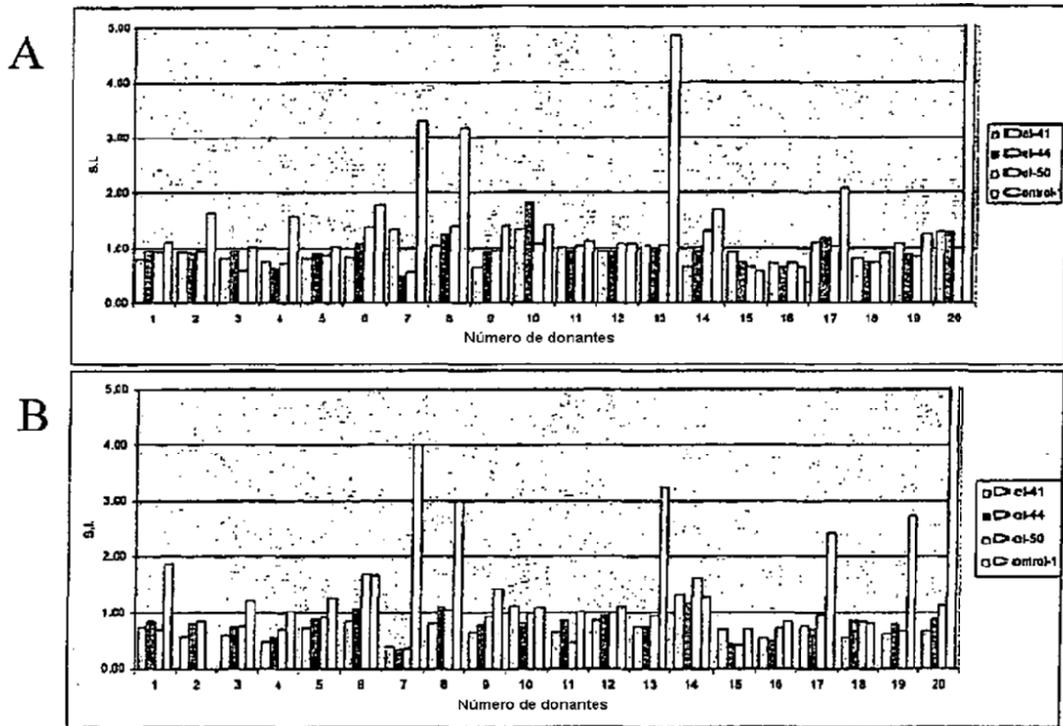


FIGURA 2

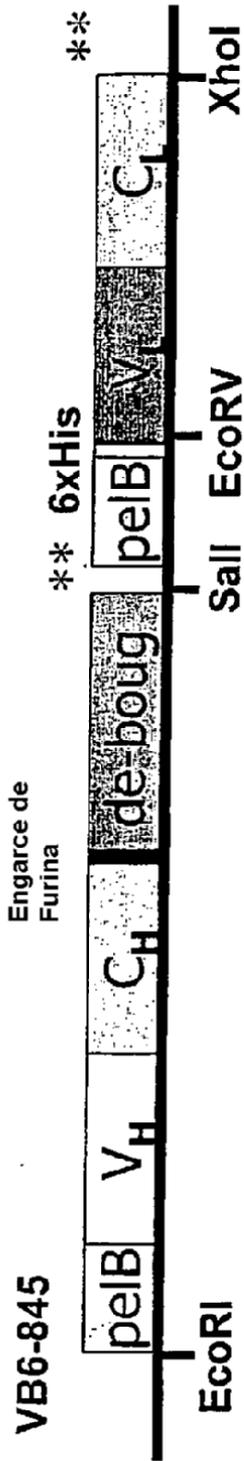


FIGURA 3A

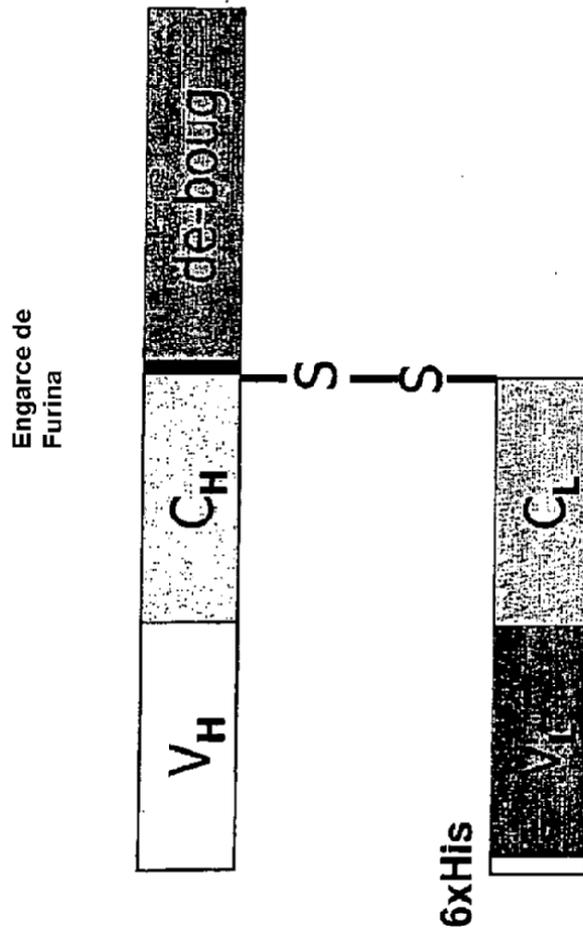


FIGURA 3C

ES 2 424 643 T3

V86-445 Pagina 1 de 2

GAATTCCTGCAGGTCTATGGAAACGATAAATGCCCATCAAATTCATATTC AAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCCTAC 85
|-----| Pe'B
N X Y I L P T
 GGTASCCGCTGGATTGTTATTACTCCCTGCCCAACCACCGATGGCGAAGTACAGCTCGTTCACTCCGCCCGGGTCTTGTTCAA 170
|-----| Pe'B |-----| inicio de VH |-----|
 A A A G L L L L A A O P A H A E Y O L V C S C P G L V O
 CCGGGTGGTTCGGTTCGTATCTCTTGGCGTGGCTTCTGGTTACAGGTCACCAACTACGGCATGAAATGGGTCAAACAGGCTCCGG 255
 P G C S V R I S C A A S C Y F F T N Y G H M W V K Q A P
 GTAAAGGCCGTGGATGGATGGGTGGATCAACACCTACACCGGTGAATCCACTAGCGTGACTCCTTCAAGGTGGCTTCAGCTTT 340
 G K G L E W H G W I N T Y T C E S T Y A D S F K G R F T F
 CTCCCTGGACACAGTGTAGTCTCATACCTCCAAATCAACTGGCTGGCTGGAGGATACAGCACTCTATTACTGGCCGGT 425
 S L D T S A S A A Y L Q I N S L R A E D T A V Y Y C A R
 TTCCGTATCAAAGGTCACTACTGGGTC AAGGACGGTGGTGGCCSTTTCCTGGGTAGCAECAAADCCCATGGSTTCTCCCC 510
|-----| extremo de VH |-----| inicio de DH |-----|
 F A I K G D Y W G G G I L L T V S S A S T K G P S V F P
 TGGCACCCCTCTECAAAGACACCTCTGGGGGACACAGCGGCTGGCTGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGGAALCGGTGACGGT 585
 L A P S S K S T S G G T A A L G C L Y K D Y F P E P V I V
 GTGGTGGAACTCAGGGCCCTGACCAAGCGGCTGCACACCTTCCCGGGTGTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC 680
 S W H S G A L T S G V H F F P A Y L O S S G L Y S L S S
 GTGGTGAAGCTGACCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACTCATCTGCAACGTGAATGACAAGGCCAGCAACACCAAGGTSSACA 765
 V V T V P S S S L G T O T Y I C H V N H K P S N T K V D
 AGAAAGTTGAGCCCAAAATCTTGTACCAAGCACAGGACCCAGAGGCTGGGAGCAGCTCTACAACACCGTCTCATTTAACCTTCS 850
|-----| extremo de CH |-----| engarce de Furina |-----| inicio de DE-Bouganina 168 |-----|
 K K V C P K S C T R H R O P R G W E Q L Y N T V S F H I G
 AGAAGETTATGAGTACCCCACTTCTATAAAGATTTGGCCCAATGAAATGGCTAAGGACAGCCAGTATGTEAACTTCCAGTGACA 935
 E A Y E Y P I F I Q D L R N E L A K G T P V C Q L P V T
 CTAAACCAATAGCCGATGACAAGGATTTGTTCTAGTTGATATCACTACGACCTCGAAGAAACAGTFAAGCTTCCATATAGATG 1020
 L O T I A D D K R F Y L Y D I I T T S K K T Y K Y A I D
 TGACAGATGTGTATGTTGGGTTATCAAGACAAATGGGATGCCAAGATCGAGCTGTTTTCCTTGACAAGGTTCCCTACTGTTGC 1105
 V T D V Y V Y G Y Q D K W D G K D R A V F L D K V P T V A
 AACTAGTAACTTTTCCAGGGCTGACTAATCCTGTAAACDTTAACATTTGATGGCAGCTATCAGAACTTGTGAATGCTGCCAAA 1190
 T S K L F P G V T N R Y T L T F D G S Y Q K L V N A A K
 GCTGATAGAAAGCCTCTCGAACTCGCCDFTTACAAATTTGGAATTTCCATTCAGGCAATCCATGCTAAAGCATAAATGCTCAAG 1275
 A O R X A L E L G V N K L E F S I E A I H S K T I N G O
 AGGCAGCCAGTCTTTCTTATTGTCATCCAAATGGTTTCAGAGCCAGCTCGGTTCAAATATATTGAGAC TGAGGTGCTTCATAG 1360
 E A A K F F L I V I Q M V S E A A R F K Y I E T E V V D R
 AGCATTATAGCAATCATCAAACTAATTTTAAAGTATTCAGCTTGGAGAACAAATGGCCCGACATCTCTCATGCCATTACAAA 1445
 G L Y G S F K P N F K V L R L E N N W S D I S D A I H K
 TCATCCCCAGAAATGACCACTATTAAATCCGCCACTTCAGTTGATAAGCCCTCAAATGACCCATGGGTTGTAAATAAAGTGAGTC 1530
 S S P Q C T T I N P A L Q L I S P S N D P W V V N K V S

FIGURA 3B

AAATTAGTCCCGATATGGGTATCCCTTAAGTTTAAAAGCTCCAAATAGTGAATAGAGTCGACCTGCACGTCATGGAACGATAAA 1615
 ┌─── extremo de DE-Bouganina 166 ───┐

Q I S P D H G I L K F K S S K . . .

TGCCCATGAAAATTCATTTCAGGGAGACACTCATAATGAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGGTGCATTGTTATTACTCGCTG 1700
 ┌──────────────────────────────────┐ PeIB ───────────────────────────────────┐
 . H K Y L L P T A A A G L L L L A

CCCAACCAGCGATGGCGCACCATCATCACCATCAGCATATCCAGATGACCCAGTCCCGCTCCTCCCTCAGTGGTCTTGTGGTGA 1785
 ┌─── PeIB ───┐ ┌─── 6xHis ───┐ ┌─── inicio de VL ───┐ ┌─── ───┐

A Q P A H A H H H H H H D I Q H T O S P S S L S A S V G D

CGGTGTACCATCACCTGCCGTTCCAGCAATCCCTGCTGCATCCCAAGGGTATCAGCTACCTTTATTGGTATCAACAGAAACGG 1870
 R V T I T C R S T K S L L H S N G I T Y L Y W Y Q Q K P

GGTAAAGCTCCGAAACTTCTGATCTACCAGATGTCGAAGCTGGCTTCCGGTGTCCGTCCTGTTCTCCAGTCTCGTTCGGTA 1955
 G K A P K L L I Y Q M S N L A S G V P S R F S S S G S G

CGGACTTACCCCTBACCATCTCTCTCTGACGCCGGAAGACTTGGCTACCTACTACTGCGCTCAGAACCAGGAAATCCCGCTAC 2040
 T D F T L T I S S L O P E D F A T Y Y C A Q N L E I P R T

CITCGGTCAGGGTACCAAAGTTGAACCTAAGCGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTCCCGCCATCTGATBAGCAGTTG 2125
 ┌─── extremo de VL ───┐ ┌─── inicio de CL ───┐ ┌─── ───┐

F G Q G T K V E L K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L

AAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAGGCC 2210
 K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A

TCCAATCGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAGCCTBAGCCTGAG 2295
 L Q S G N S O E S V T E O D S K D S T Y S L S S T L T L S

CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAAC 2380
 K A D Y E K H K Y Y A C E V T H O G L S S P V T K S F N

AGGGGAGAGTGTAGCTCGAG 2404
 ┌─── extremo de CL ───┐

R G E C . . .

FIGURA 3B CONT.

Mapa del vector de expresión. Los insertos se ligan en el vector 3302 usando los sitios de restricción EcoRI y XhoI

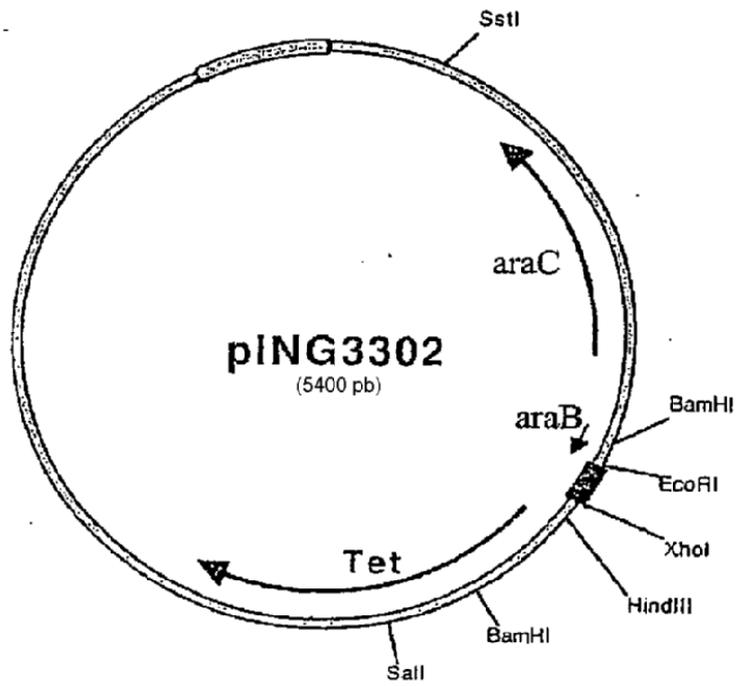


FIGURA 4

VB5-845

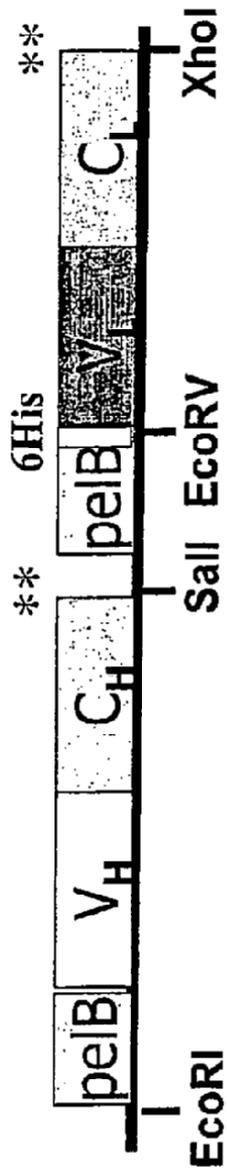


FIGURA 5A

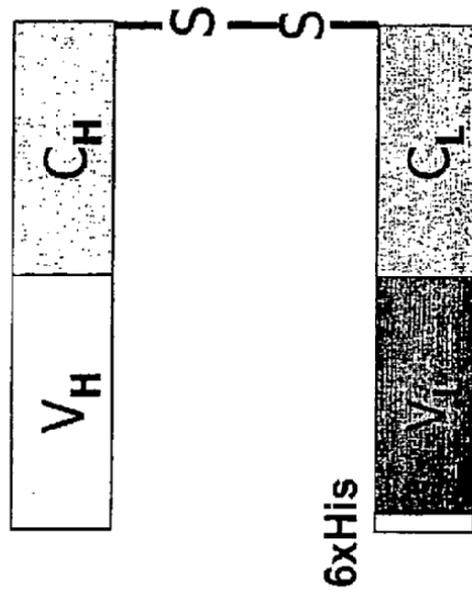


FIGURA 5C

GAATTCCTGCAGGTCATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTAC 85
 PelB

M K Y L L P T

GGCAGCCGCTGGATTGTATTACTCGCTGCCCAACCAGCSATGGCGGAAGTACAGCTGGTTTCAGTCCGGCCGGGTCTTGTTCAA 170
 PelB inicio de VH →

A A A G L L L L A A D P A M A E V Q L V Q S G P G L V Q

CCGGTGGTTCCGTTTCGATCTCTTGCCTGCTTCTGGTTACAGTTCCACCAACTACGGCATGAACTGGGTCAAACAGGCTCCGG 255
P G G S V R I S C A A S G Y T F T N Y G M N W V K O A P

GTAAGCCCTGGAAATGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGGTGAATCCACCTACGCTGACTCCTTCAAAGGTGCTTCACTTT 340
G K G L E W M G W I N T Y T G E S T Y A D S F K G R F T F

CTCCCTCGACACAAGTCTAGTCTGCATACCTCCAAATCAACTCGCTGCGTGCAGAGGATACAGCAGTCTATTACTGCGCCCGT 425
S L O T S A S A A Y L O I N S L R A E D T A V Y Y C A R

TTGCTATCAAAGGTGACTACTGGGGTCAAGGCACGCTGCTGACCGTTTCTCGGCTAGCACCAAAGGCCCATCGGTCTTCCCC 510
 extremo de VH inicio de CH →

F A I K G D Y W G O G T L L T V S S A S T K G P S V F P

TGGCACCCTCCTCAAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT 595
L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V

GTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGCTCTACAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC 680
S W N S G A L T S G V H T F P A V L O S S G L Y S L S S

GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACA 765
V V T V P S S S L G T O T Y I C N V N H K P S N T K V D

AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTAGTGATCTAGAGTCGACCTGCAGGCTCTATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTCTATTT 850
 extremo de CH →

K K V E P K S C . . .

AAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTATTACTCGCTGCCAACCAGCGATGGGGCACC 935
 PelB Ex

M K Y L L P T A A A G L L L L A A D P A M A H

ATCATCACCATCAGGATATCCAGATGACCCAGTCCCGTCCCTCCCTGAGTGCTTCTGTTGGTGACCGTGTACCATCACCTGCCG 1020
 Ex-His inicio de VL →

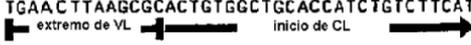
H H H H H D I O M T O S P S S L S A S V G D R V T I T C R

TTCCACCAAATCCCTCCTGCACTCCAACGGTATCACCTACCTTATTGGTATCAACAGAAACCGGGTAAAGTCCGAAACTTCTG 1105
S T K S L L H S N G I T Y L Y W Y Q O K P G K A P K L L

FIGURA 5B

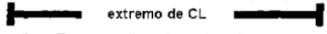
ATCTACCAGATGTCCAACCTGGCTCCGGTGTCCGTCCTCGTTTCTCCAGTTCTGGTTCTGGTACCGACTTCACCCCTGACCATCT 1190
 I Y Q M S N L A S G V P S R F S S S G S G T D F T L T I

CTTCCTCAGCGGGAAGACTTCGCTACCTACTACTGCGCTCAGAACCCTGGAATCCCGCGTACCTTCGGTCAGGGTACCAAAGT 1275
 S S L Q P E D F A T Y Y C A Q N L E I P R T F G Q G T K V

TGAAC TTAAGCGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTT 1360

 E L K R T V A A P S V F I F P P S D E O L K S G T A S V

GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCDAGG 1445
 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L O S G N S Q

AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA 1530
 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H

CAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGTAGCTC 1615

 K V Y A C E V T H D G L S S P V T K S F N R G E C . . .

GAG 1618

FIGURA 5B CONT.

VB6-845-CL-de-bouganina

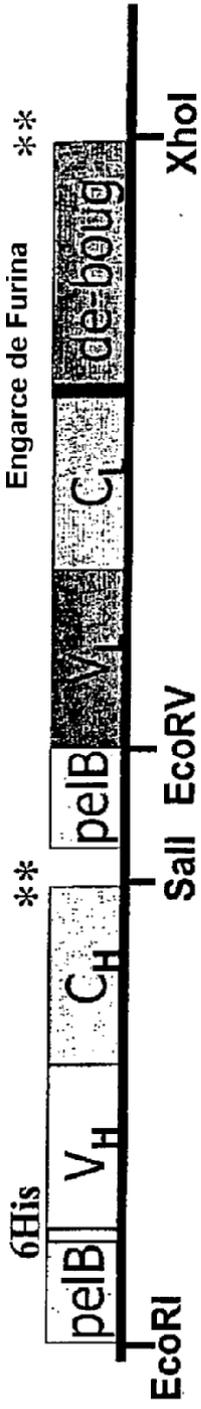


FIGURA 6A

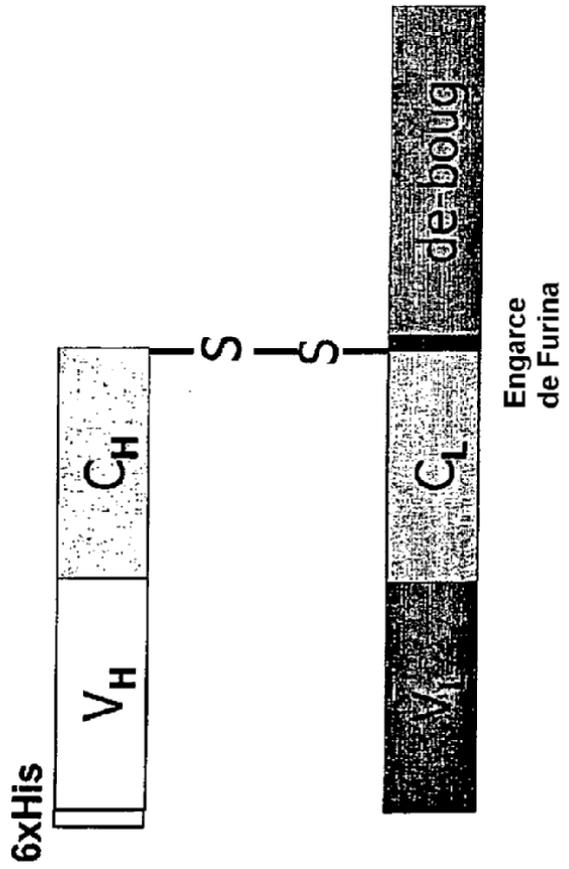


FIGURA 6C

VBB-845 CL-Boug Pagina 1 de 3

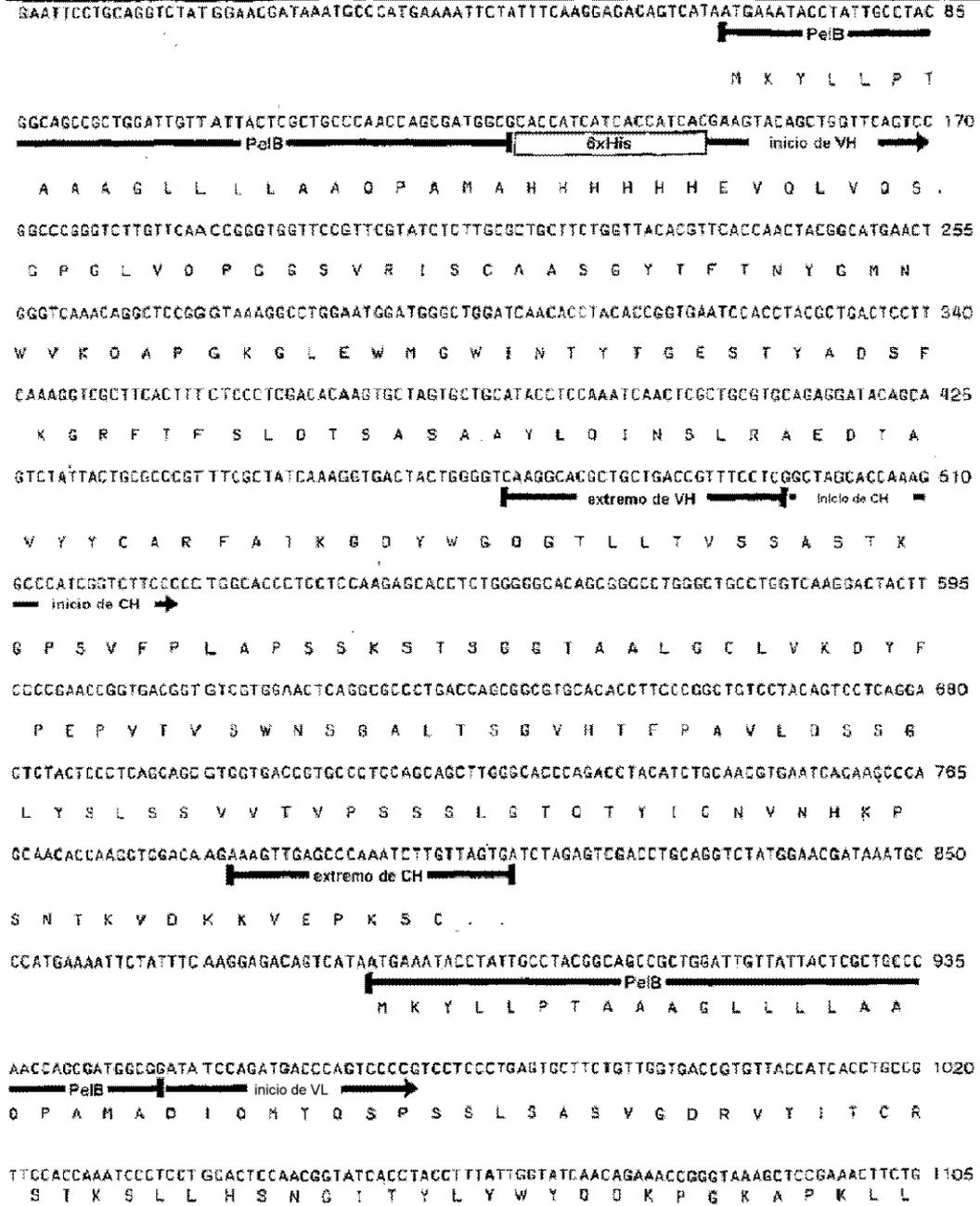
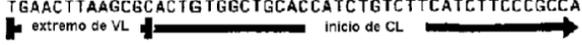


FIGURA 6B

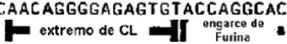
ATCTACCAGATGTCCAACCTGGCTTCCGGTGTCCGTCTCGTTTCTCCAGTTCTGGTCTGGTACCGACTTACCCTGACCATCT 1190
I Y Q M S N L A S G V P S R F S S S G S G T D F T L T I

CTTCTCTGCAGCCGGAAAGACTTCGCTACCTACTACTGCGCTCAGAACCTGGAAATCCCGGTACCTTCGGTCAGGBTACCAAAGT 1275
S S L O P E D F A T Y Y C A O N L E I P R T F G O G T K V

TGAAC TTAAGCGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAC TGCCTCTGTT 1360

E L K R T V A A P S V F I F P P S D E O L K S G T A S V

GTGTCCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG 1445
Y C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L O S G N S O

AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACA 1530
E S V T E O D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H

CAAAGTCTAGGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTACCAGGCAC 1615

K V Y A C E V T H O G L S S P V T K S F N R G E C T R H

AGGCAGCCCAGAGGCTGGGAGCAGCTCTACAACACCGTGTCAATTAACCTTGGAGAAGCTTATGAGTACCCCACTTTTATACAAG 1700

R O P R G W E O L Y N T V S F N L G E A Y E Y P T F I O

ATTTGCGCAATGAATTGGCTAAGGGCACACCAGTATGTCAACTTCCAGTGACACTACAAACCATAGCCGATGACAAGCGATTTGT 1785
D L R N E L A K B T P V C O L P V T L O T I A D O K R F V

TCTAGTTGATATCACTACGACCTCGAAGAAAACAGTTAAGGTTGCTATAGATGTGACAGATGTGTATGTTGTGGGTTATCAAGAC 1870
L V D I T T T S K K T V K V A I D V T D V Y V V G Y O D

AAATGGGATGGCAAAGATCGAGCTGTTTTCCCTTGACAAGGTTCCCTACTGTTGCAACTAGTAAACTTTTCCAGGGGTGACTAATC 1955
K W D G K D R A V F L D K V P T V A T S K L F P G V T N

GTGTAACGTTAACATTTGATGGCAGCTATCAGAAACTTGTGAATGCTGCCAAAGCTGATAGAAAGGCTCTCGAACTGGGGGTTAA 2040
R V T L T F D G S Y O K L V N A A K A D R K A L E L G V N

CAAATTGGAATTTTCCATTGAAGCAATCCATGGTAAAACGATAAATGGTCAAGAGGCAGCCAAGTTCTTTCTTATTGTCATCCAA 2125
K L E F S I E A I H G K T I N G O E A A K F F L I V I O

ATGGTTTCAGAGGCAGCTCGGTTCAAATATATTGAGACTGAGGTTGGTTGATAGAGGATTATATGGATCATTCAAACCTAATTTTA 2210
M V S E A A R F K Y I E T E V V D R G L Y G S F K P N F

AAGTATTGAACTTGGAGAACAATTGGGGCGACATCTCTGATGCCATTCAAAATCATCCCAATGTACCACTATTAATCCGBC 2295
K V L N L E N N W G D I S D A I H K S S P O C T T J N P A

FIGURA 6B CONT.

ACTTCAGTTGATAAGCCCTCAAATGACCCATGGGTTGTAATAAAAGTGAGTCAAATTAGTCCCGATATGGGTATCCTTAAGTTT 2380

extremo de De-Bouganina 156

L O L I S P S N D P W V V N K V S Q I S P D M G I L K F

AAAAGCTCCAAATAGTAGCTCGAG 2404

extremo de De-Bouganina 156

K S S K . . .

FIGURA 6B CONT.

VB6-845-NV_H-de-bouganina



FIGURA 7A

Engarce de Furina

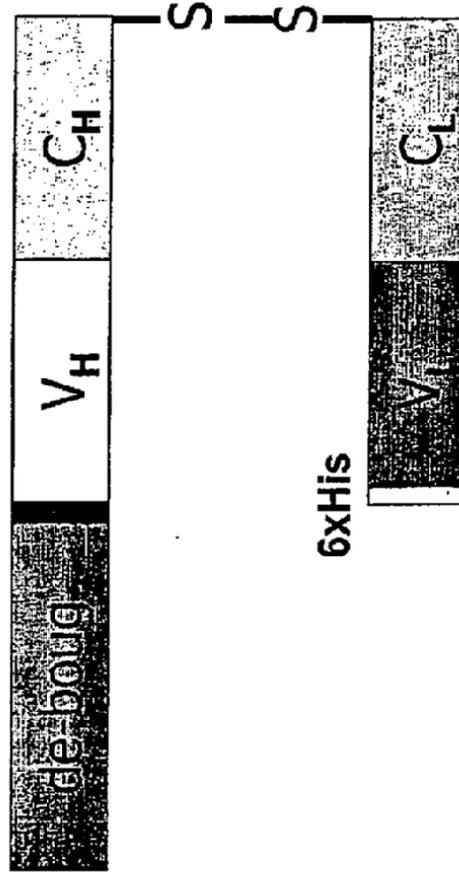


FIGURA 7C

GAATTCCTGCAGGTCTATGGAACGATAAATGCCATGAAAATTCATTTCAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTAC 85
 PelB

H K Y L L P T

GCCAGCCCGTGGATTGTTATTACTCGCTCCCAACCAGCGATGCCGTACAACACCGTGTCATTAACTTTGGAGAAGCTTATGAG 170
 PelB inicio de De-Bouganina 156

A A A G L L L L A A O P A H A Y N T V S F N L G E A Y E
TACCCCACTTTTATACAAGATTTCGCAATCAATFGGCTAAGGGCACACCAGTATGTCAACTTCCAGTGACACTACAAACCATAG 255
Y P T F I O D L R N E L A K G T P V C O L P V T L O T I
CCGATGACAAAGCATTGTCTAGTTGATATCACTACGACCTCGAAGAAAACAGTTAAGTTGCTATAGATGTGCAGATGTGTA 340
A D D K R F V L V D I T T T S K K T V K V A I D V T D V Y
TGTGTGGTTATCAAGACAAATGGGATGGCAAAGATCGAGCTGTTTTCTTGACAAGGTTCCACTGTTGCAACTAGTAACTT 425
V V G Y O D K W D G K D R A V F L O K V P T V A T S K L
TTECCAGGGGTGACTAATCGTGAACGTTAACATTGATGGCAGCTATCAGAAACTTGTGAATGCTGCCAAAGCTGATAGAAAGG 510
F P G V T N R V T L T F D G S Y Q K L V N A A K A D R K
CTCTGCAACTGGCGTTAAACAAATTCGAATTTCCATTGAAGCAATCCATGGTAAACGATAAATGTCAGAGGCGCAAGT 595
A L E L G V N K L E F S I E A I H G K T I N G O E A A K F
CTTCTATTGTCATCAAAATGGTTTCAGAGGCAAGCTCGGTTCAAATATATTGAGACTGAGGTGGTTGATAGAGGATTATATGCA 680
F L I V I O H V S E A A R F K Y I E T E V V D R G L Y G
TCATTCAAACCTAATTTAAAGTATTGAACCTGGAGAACAATGGGGCGACATCTCTGATGCCATTACAAAATCATCCCCACAAT 765
S F K P N F K V L N L E N N W G D I S D A I H K S S P D
GTACCACTATFAATCCGGCACTTCAGTTGATAACCCCTCAAATGACCCATGGCTGTAATAAAGTGAGTCAAATAGTCCCGA 850
C T T I N P A L Q L I S P S N D P W V V N K V S O I S P D
TATCGGTATCGCTTAAGTTTAAAGCTCCAAAACAGGCACAGCCAGCCAGAGGCTGGGAGCAGCTCGAAGTACAGCTGGTTGAG 935
 extremo de De-Bouganina 156 Engarce de Furina inicio de VH

H C I L K F K S S K T R H R O P R G W E Q L E V Q L Y Q
TCCGGCCCGGTTCTTGTCAACCGGGTGGTTCCGTTGCTATCTCTTCCGCTGCTTCTGGTTACACGTTCCACCAACTACGGCATGA 1020
S G P G L V O P G G S V R I S C A A S G Y T F T N Y G H
ACTGGGTCAAACAGGCTCCGGTAAAGGCGTGAATGGAATGGGCTGGATCAACACCTACACCGTGAATCCACCTACGCTGACTC 1105
N W V K O A P G K G L E W H G W I N T Y T G E S T Y A O S
CTTCAAAGGTCGCTTCACTTTCCCTCGACACAAGTGC TAGTGCTGCATACCTCCAATCAACTCGCTCGGTGACAGGATACA 1190
F K G R F T F S L D T S A S A Y L O I N S L R A E D T
GCAGTCTATTACTCGCCCGTTCGCTATCAAAGTGACTACTGGGTCAAGCCAGCTGCTGACCGTTTCTCCGCTAGCACCA 1275
 extremo de VH inicio de CH

A V Y Y C A R F A I K G D Y W G O G T L L T V S S A S T
AAGGCCCATCGGTTTCCCGCTGGCACCTCTCCCAAGACCAECTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGCTGCTGCTGCTCAAGGACTA 1360
 inicio de CH

K C P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K O Y
CTTCCCCGAACCGGTGACGGTCTCGTGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCTGGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCA 1445
F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L O S S

FIGURA 7B

GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGC 1530
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K
 CCACCAACACCAAGCTCCACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTTAGTGTCTAGAATCGACCTGCAGGTCTATGGAACGATAAA 1615
 ┌─────────────────── extremo de CH ────────────────────┐
 P S N T K V D K K V E P K S C . . .
 TGCCCATGAAAATCTATTTCAAGCAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTG 1700
 ┌── PeIB ───┐
 H K Y L L P T A A A G L L L L A
 CCCAACCCAGCGATGCCGCCACCATCATCACCATCAGATATCCAGATGACCCAGTCCCGCTCCCTGAGTGCCTCTGTTGCTGA 1785
 ┌────────── PeIB ───────────┐ ┌────────── 6xHis ───────────┐ ┌────────── inicio de VL ───────────┐
 A D P A M A H H H H H H D I O H T Q S P S S L S A S V G D
 CCGTGTACCATCACCTGCCGTTCCACCAAAATCCCTCCCTGCACCTCCAAACGGTATCACCTACCTTTATTGGTATCAACAGAAACCG 1870
 R V T I T C R S T K S L L H S N G I T Y L Y W Y O O K P
 GGTAAAGCTCCGAAACTCTGATCTACCAGATGTCCAACTGGCTTCCCGTGTCCGCTCGTITTCAGTTCCTCGTTCGTGTA 1955
 G K A P K L L I Y D H S N L A S G V P S R F S S S G S G
 CCGACTTCACCTGACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCTACCTACTAC TCCGCTCAGAACCTGGAAATCCCGCGTAC 2040
 T O F T L T I S S L O P E D F A T Y Y C A O N L E I P R T
 CTTCCGTCAGGTTACCAAGTTGAACCTAAGCGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTC 2125
 ┌────────── extremo de VL ───────────┐ ┌────────── inicio de CL ───────────┐
 F G O G T K V E L K R T V A A P S V F I F P P S D E O L
 AAATCTGGAATGCTCTCTGTTGTGCTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGC CAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCC 2210
 K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A
 TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGGACAGGACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAG 2295
 L O S G N S O E S V F E O D S K D S T Y S L S S T L T L S
 CAAACCCACTACGAGAAACAAAGTCTACGCTCGGAAGTCAACCCATCAGGGCC TGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAAC 2380
 K A D Y E K H K V Y A C E V T H O G L S S P V T K S F N
 ACGGGAGAGTGTAGTACCTCGAG 2404
 ┌────────── extremo de CL ───────────┐
 R G E C . . .

FIGURA 7B CONT.

VB6-845-NV_L-de-bouganina

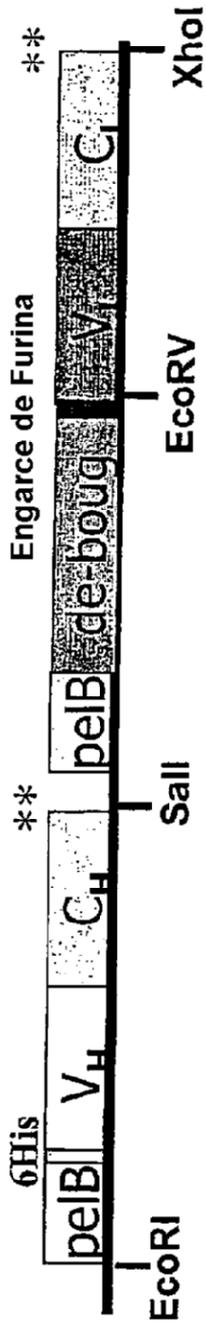


FIGURA 8A

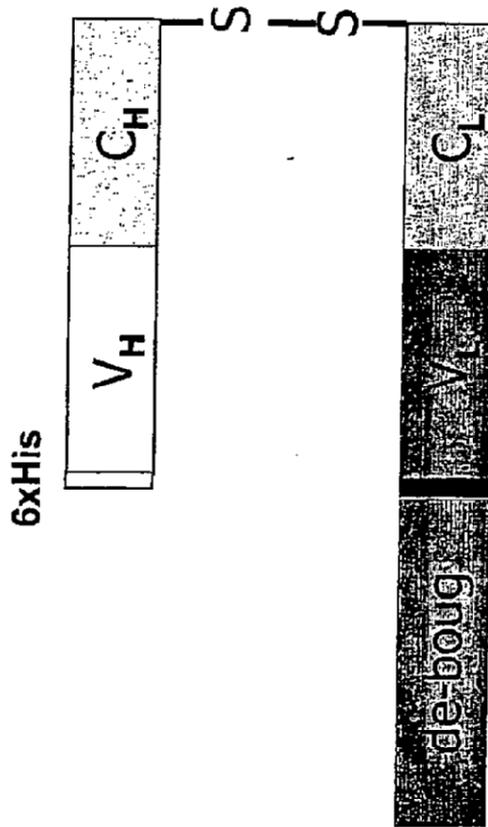


FIGURA 8C

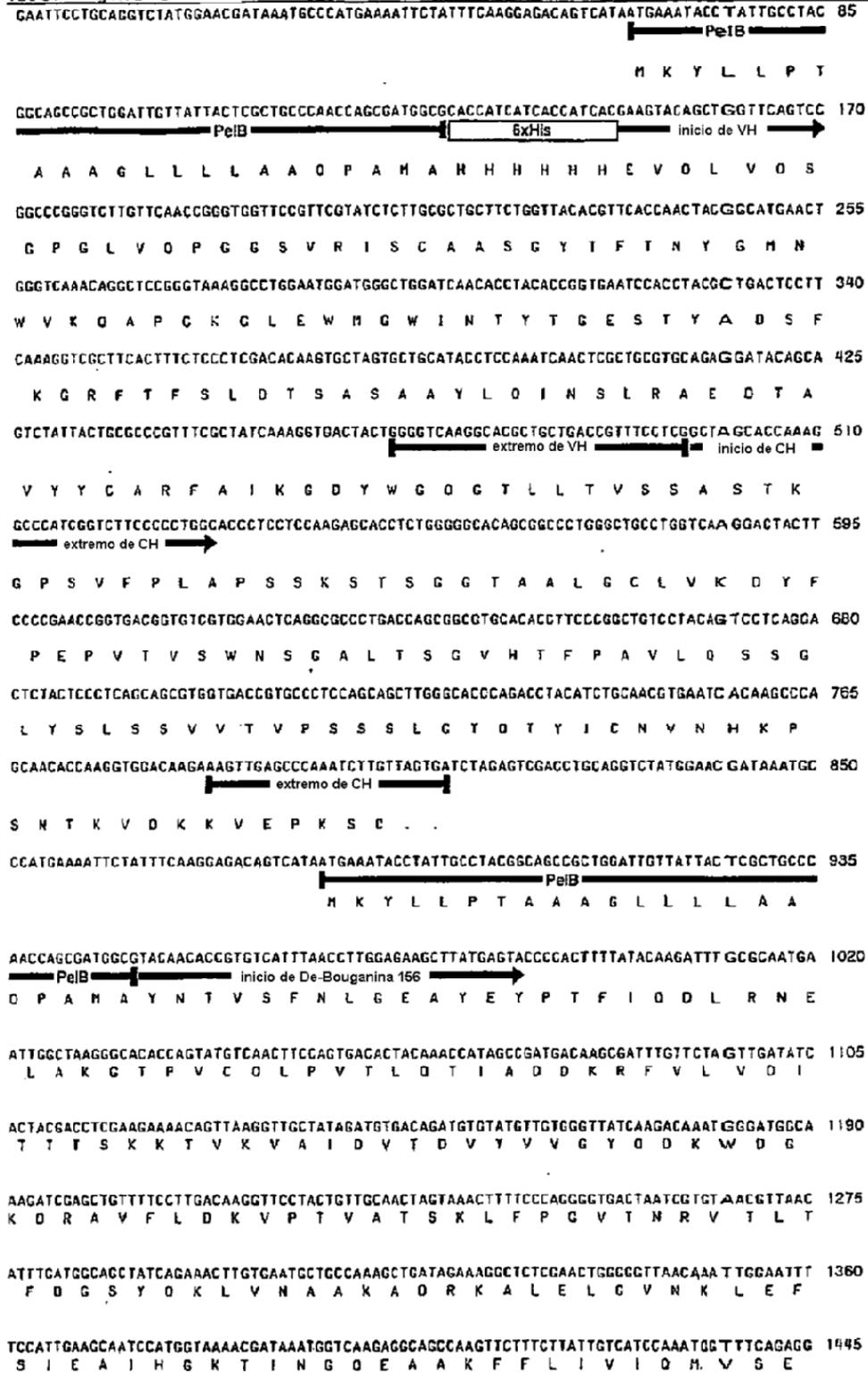


FIGURA 8B

CAGCTCGGTTCAAATATATTGCACTGAGGTGGTTGATAGAGGATTATATGGATCATTCAAACCTAATTTTAAAGTATTGAAC TT 1530
 A A R F K Y I E T E V V D R G L Y G S F K P N F K V L N L

CGAGAACAATTGGGGCACATCTGTGATGCCATTCAAAATCATECCCAATGTACCACATTAAATCCGGCACTTCAGTTGATA 1615
 E N N W G D I S D A I H K S S P O C T T I N P A L O L I

AGCCCTCAAATGACCCATGGGTGCTAAATAAAGTGAGTCAAATTAGTCCCGATATGGGTATCCTTAAGTTAAAAGTCCAAAA 1700
 S P S N O P W V V N K V S O I S P D H G I L K F K S S K

CCAGGCACAGCCACCCAGAGGCTGGCAGCAGCTCGATATCCAGATGACCCAGTCCCGCTCCCTGAGTCTCTGTGTGTTGA 1785
 Engarce de Furina inicio de VL
 T R H R O P R C W E O L D I O H T O S P S S L S A S V G D

CGGTGTACCATCACCTGCGGTTCCACCAAATCCCTCCCTGCAGTCCCAACGGTATCACCTACCTTTATTGGTATCAACAGAAACCG 1870
 R V T I T C R S T K S L L H S N G I T Y L Y W Y O Q K P

GGTAAAGCTCCGAACTTCTGATCTACCAGATGTCCAACCTCGCTTCGGTGTCCGCTCGTTTCTCCAGTCTCGTTCTGTTA 1955
 G K A P K L L I Y O M S N L A S G V P S R F S S S G S G

CCCAGTTCAGCTGACCATCTCTTCTCTCAGCCGGAAGACTTGCTACCTACTACTGCGCTCAGAACCTGCAAAATCCCGGTAC 2040
 T D F T L T I S S L O P E D F A T Y Y C A O N L E I P R T

CTTCGGTCAGGTACCAAAGTTGAAGTAAAGCCGACTGTGCTGCACCATCTGCTTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTG 2125
 extremo de VL inicio de CL
 F G Q G T K V E L K R T V A A P S V F I F P P S D E O L

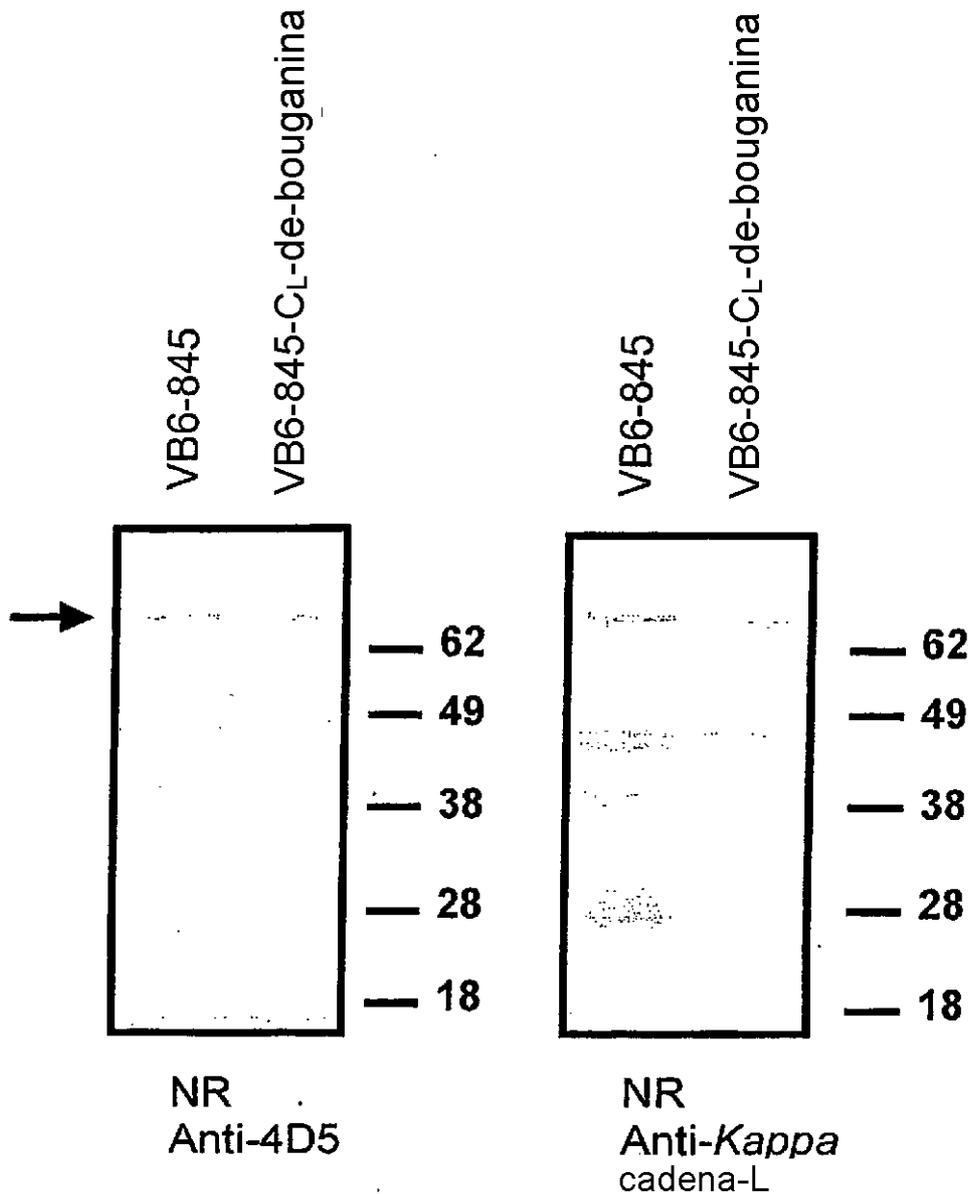
AAATCTGGAAGTCCCTCTGTTCTGCTCCCTGCTGAATAAAGTCTATCCACAGAGCCCAAAGTACAGTCCAAAGTGCATAACCC 2210
 K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V O W K V D N A

TCCAATCGGGTAACTCCAGGAGACTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACBCTGAG 2295
 L O S G N S O E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S

CAAGCCAGACTACCAGAAACAAAGTCTACGCTCGGAAGTCAACCAATCAGGGCTGAGTCCCGCTCACAAAGAGCTTCAAC 2380
 K A D Y E K H K V Y A C E V T H D G L S S P V T K S F N

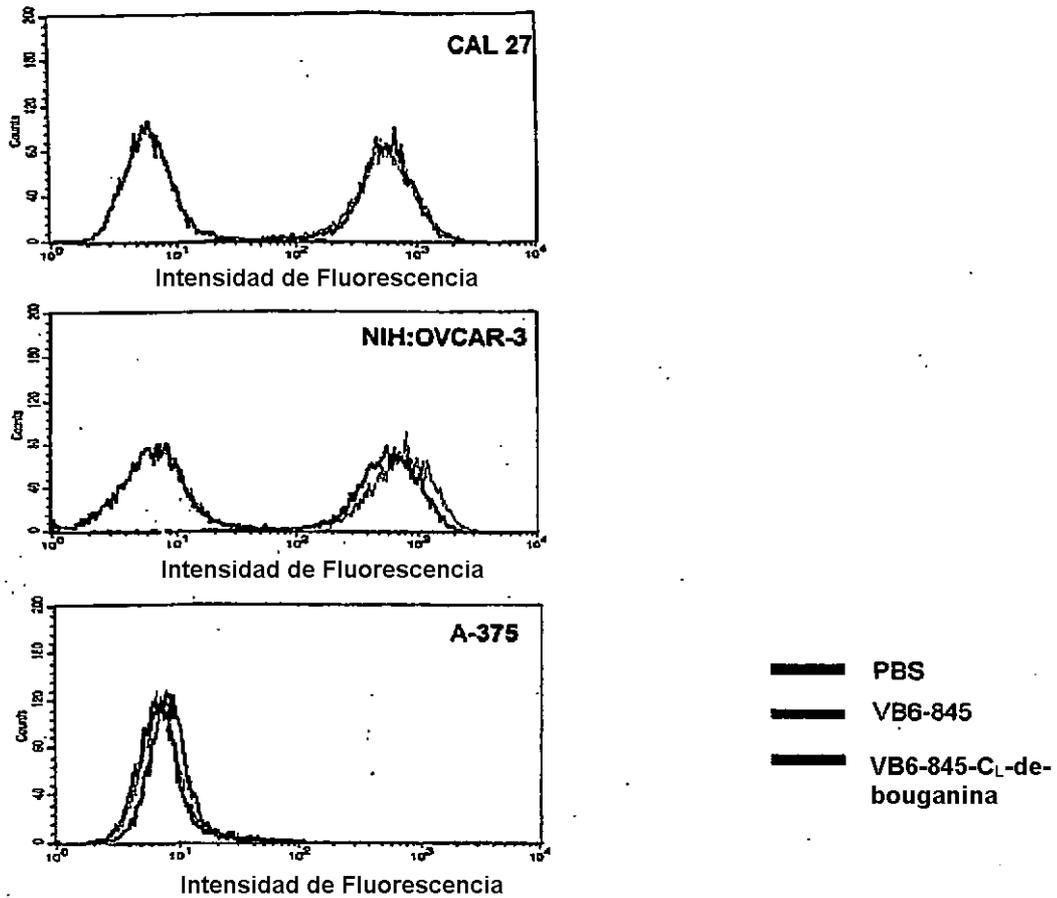
AGGGGAGAGTGTAGTACCTCGAG 2404
 extremo de CL
 R G E C . .

FIGURA 8B CONT.



Las figuras ilustran la expresión de VB6-845 y VB6-845-CL-de-bouganina en el sobrenadante de células E104 inducidas a escala de laboratorio (matraz agitador). Una parte alícuota del sobrenadante, 16 μ l, se cargó en condiciones no reductoras en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE y se analizó por transferencia de Western usando un anticuerpo anti-4D5 policlonal de conejo, seguido de un anticuerpo anti-conejo de cabra (1/2000), o anti cadena L-*Kappa* humana de cabra conjugado con HRP (1/1000), para confirmar la identidad y el tamaño de la proteína recombinante. La flecha indica la longitud completa de VB6-845 y VB6-845-CL-de-bouganina. La transferencia de Western del sobrenadante del cultivo E104 no inducido reveló bandas no correspondientes lo que demuestra la especificidad de los anticuerpos.

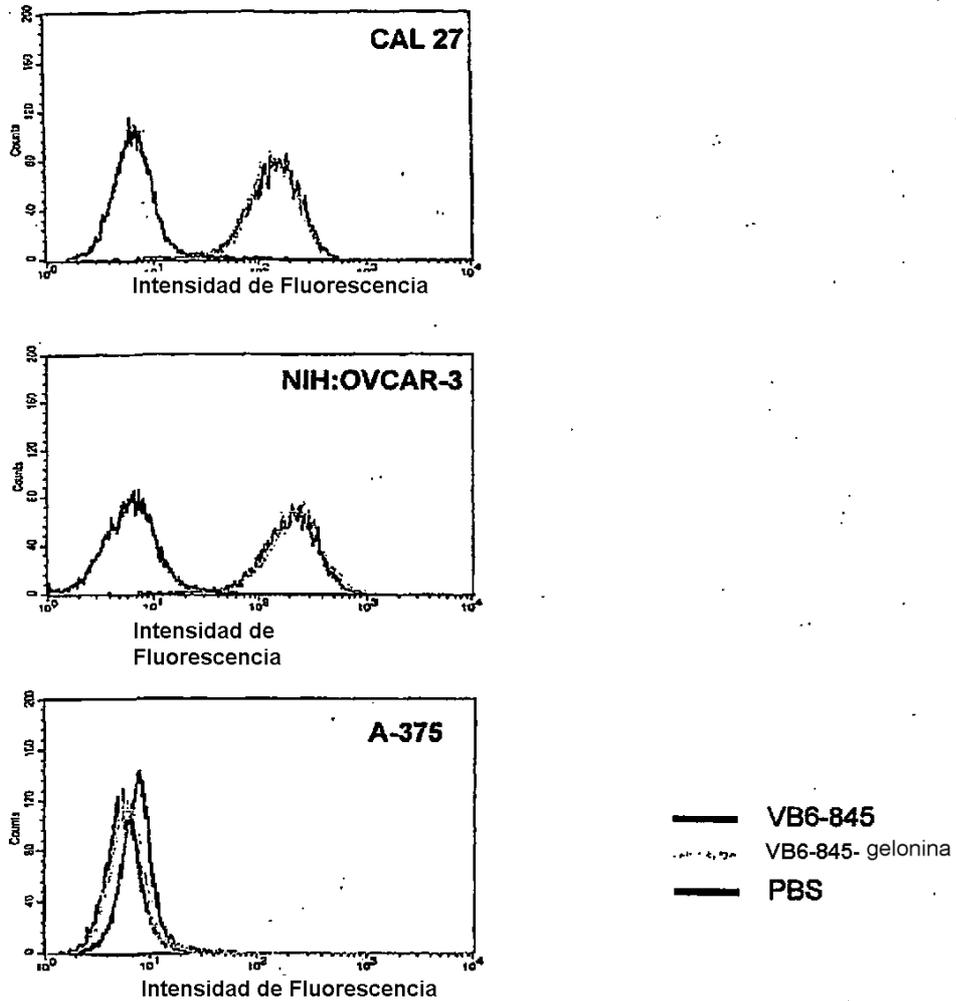
FIGURA 9



Reactividad de VB6-845 y VB6-845-CL-de-bouganina, detectada por citometría de flujo. La reactividad y la especificidad de VB6-845 y VB6-845-CL-de-bouganina se evaluaron con las líneas celulares Ep-CAM-positivas, CAL 27 y NIH:OVCAR-3 y la línea celular Ep-CAM negativa A-375. Brevemente, se incubaron VB6-845 y VB6-845-CL-de-bouganina con $0,45 \times 10^6$ células durante una hora en hielo. Después del lavado, VB6-845 y VB6-845-CL-de-bouganina unidas a la superficie celular se detectaron con anti-bouganina de conejo durante una hora en hielo. Las células se lavaron y se incubaron con anti IgG de conejo de oveja conjugado con FITC durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS con FCS al 5 % que contenía yoduro de propidio para evaluar la unión de los anticuerpos por citometría de flujo.

No se detectaron cambios en la fluorescencia media después de incubación con VB6-845 y VB6-845-CL-de-bouganina con A-375. Por otro lado, se observó un cambio en la fluorescencia media con las líneas celulares Ep-CAM positivas, CAL 27 y NIH:OVCAR-3.

FIGURA 10A

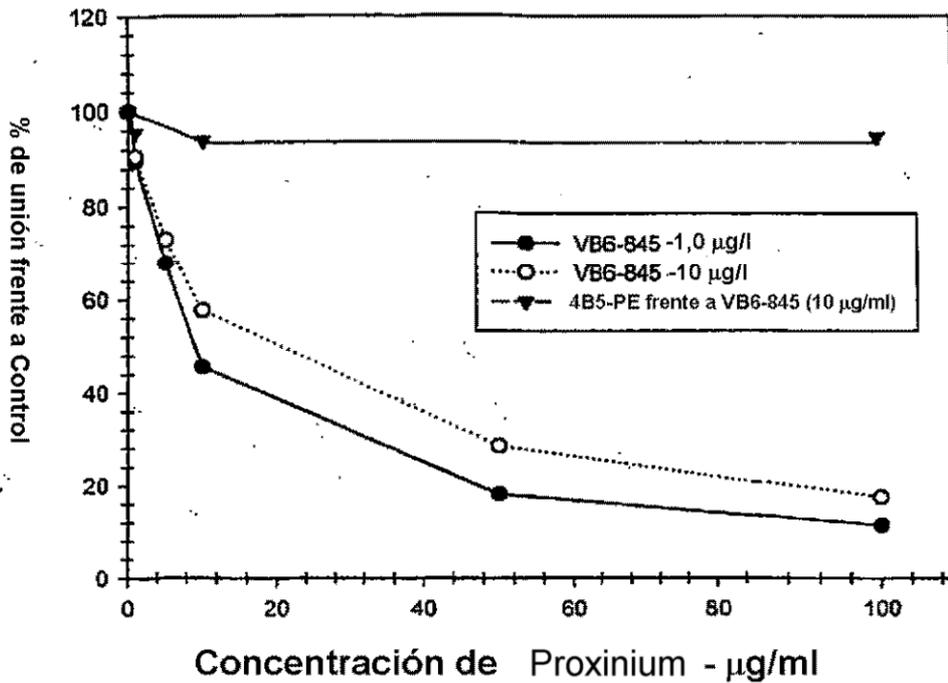


Reactividad de VB6-845-gelonina en comparación con VB6-845.

La actividad biológica de VB6-845-gelonina se comparó con VB6-845 por citometría de flujo. La reactividad y la especificidad de VB6-845-gelonina y VB6-845 se evaluaron con las líneas celulares Ep-CAM-positivas, CAL 27 y NIH:OVCAR-3 y la línea celular Ep-CAM negativa A-375. Brevemente, VB6-845-gelonina y VB6-845 se incubaron con $0,45 \times 10^6$ células durante una hora en hielo. Después del lavado, la VB6-845-gelonina y VB6-845 unidas a la superficie celular se detectaron con una etiqueta anti His de ratón durante una hora en hielo. Las células se lavaron y se incubaron con anti IgG de ratón de oveja conjugado con FITC durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS con FCS al 5 %, que contenía yoduro de propidio para evaluar la unión de los anticuerpos por citometría de flujo.

FIGURA 10B

Ensayo de competencia - VB6-845 y Proxinium - NIH:OVCAR-3



Condiciones:

- $0,3 \times 10^6$ células/grupo.
- concentraciones de VB6-845 y Proxinium mezcladas en iguales volúmenes.
- 1 h de incubación en hielo.
- dilución 1/200 de anti-bouganina de conejo-biotina como 2º Ab-1 hora en hielo.
- fluorocromo – dilución 1/120 de estreptavidina – citocromo – 1/2 h en hielo.
- 100 % unido – 0 µg/ml de Proxinium.

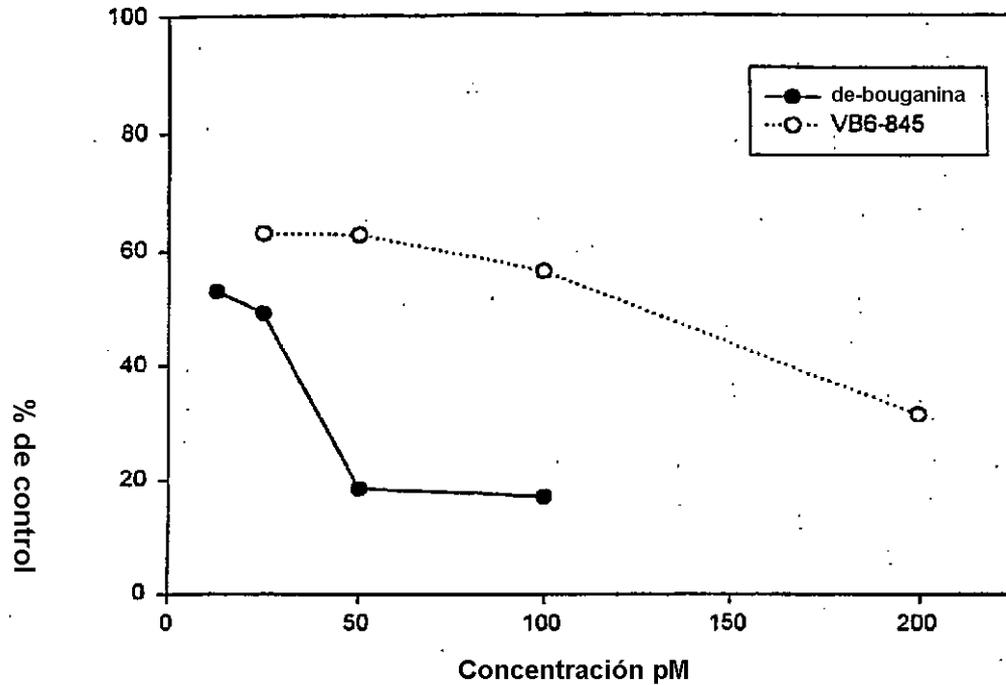
Ensayo de competencia entre VB6-845 y Proxinium™ por citometría de flujo:

VB6-845 a 1 y 10 µg/ml y concentraciones en aumento de Proxinium™ que variaban de 0 a 100 µg/ml, se incubaron con células NIH:OVCAR-3. Después de 1 hora de incubación a 4 °C, las células se lavaron y la unión de VB6-845 se detectó con un anti-bouganina de conejo biotinilado seguido por estreptavidina-citocromo.

Se realizó el mismo experimento con 4B5-PE que se usó como un control negativo.

FIGURA 11

Ensayo acelar

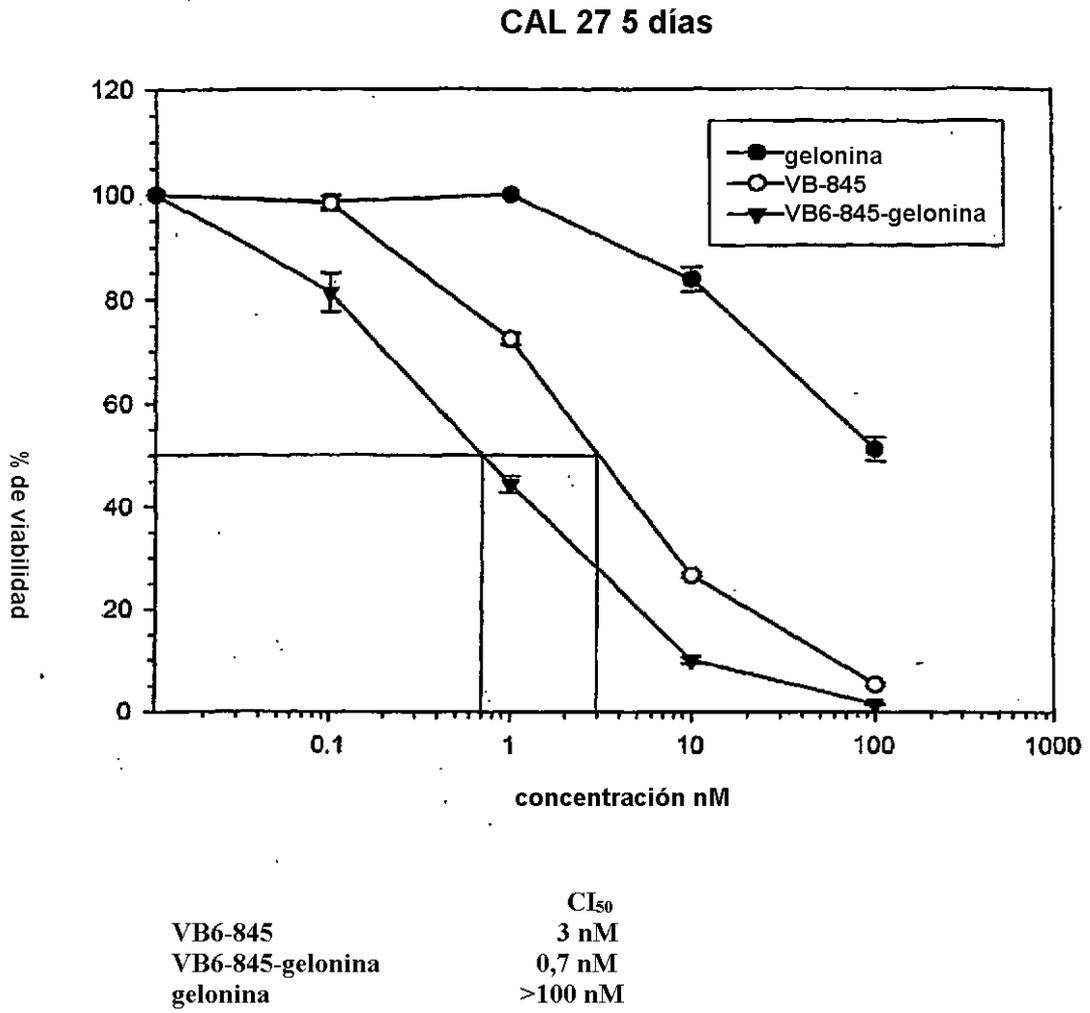


Las proteínas VB6-845 y de-bouganina purificadas, a diversas concentraciones se incubaron a 30 °C durante 90 minutos con la siguiente mezcla:

Lisado de reticulocitos de conejo Flexi	35 µl
Mezcla de aminoácidos, sin leucina	1 µl
³ H-leucina	5 µl
Cloruro de potasio	1,4 µl
RNasin	1 µl
ARN control luciferasa, 1 mg/ml	1 µl
Hasta un volumen final de 50 µl	

Después de completarse la reacción de traducción, se tomó una muestra de 2 µl, se mezcló con 98 µl de NaOH 1 M/H₂O₂ al 2 % y se incubó a 37 °C durante 10 minutos. La proteína traducida se precipitó con la adición de TCA al 25 % enfriado con hielo/casaminoácidos al 2 % y se incubó en hielo durante 30 minutos. Después el precipitado se recogió en un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C (prehumedecido con TCA enfriado al 5 %) por centrifugación a 8000 rpm durante 5 minutos. El filtro se aclaró 3 veces con TCA al 5 % enfriado con hielo y una vez con acetona. Después de secar el filtro, se añadió mezcla de centelleo y los recuentos se determinaron en un contador de centelleo líquido.

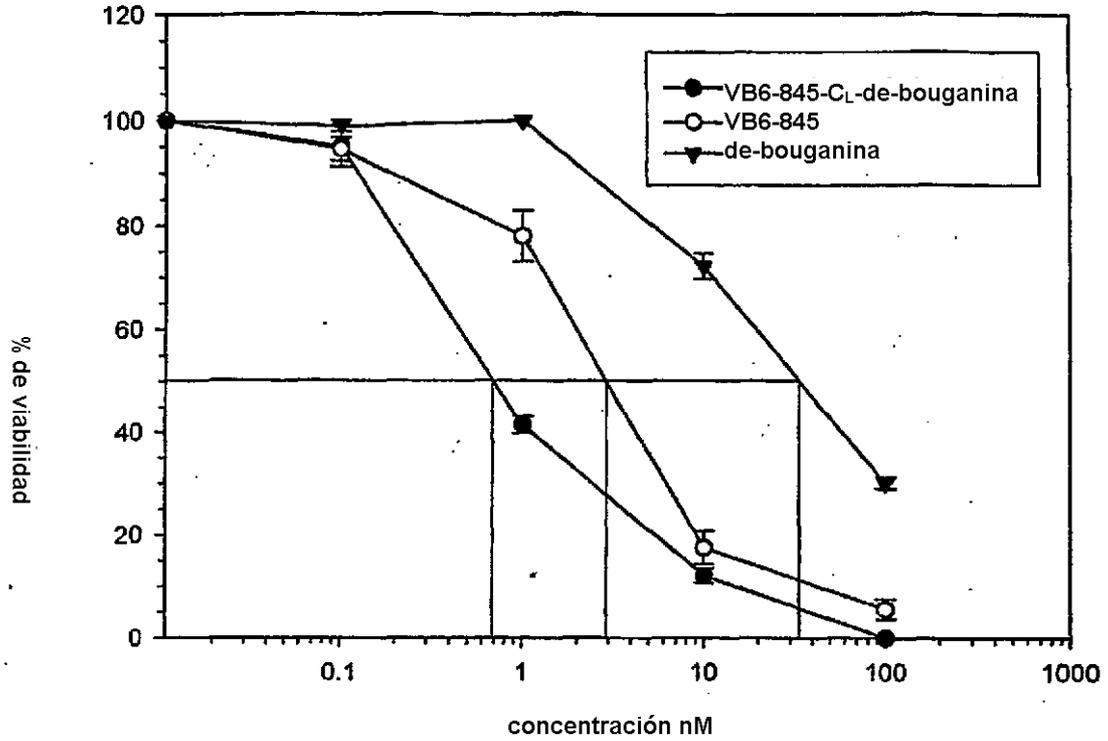
FIGURA 12



Citotoxicidad *in vitro* de VB6-845-gelonina. Ensayo con MTS de VB6-845-gelonina en comparación con VB6-845: se incubaron células CAL 27 con una concentración equimolar de VB6-845, VB6-845-gelonina y gelonina que variaba de 100 a 0,1 nM. Después de 5 días de incubación, se midió la viabilidad y se determinó el valor CI₅₀.

FIGURA 13A

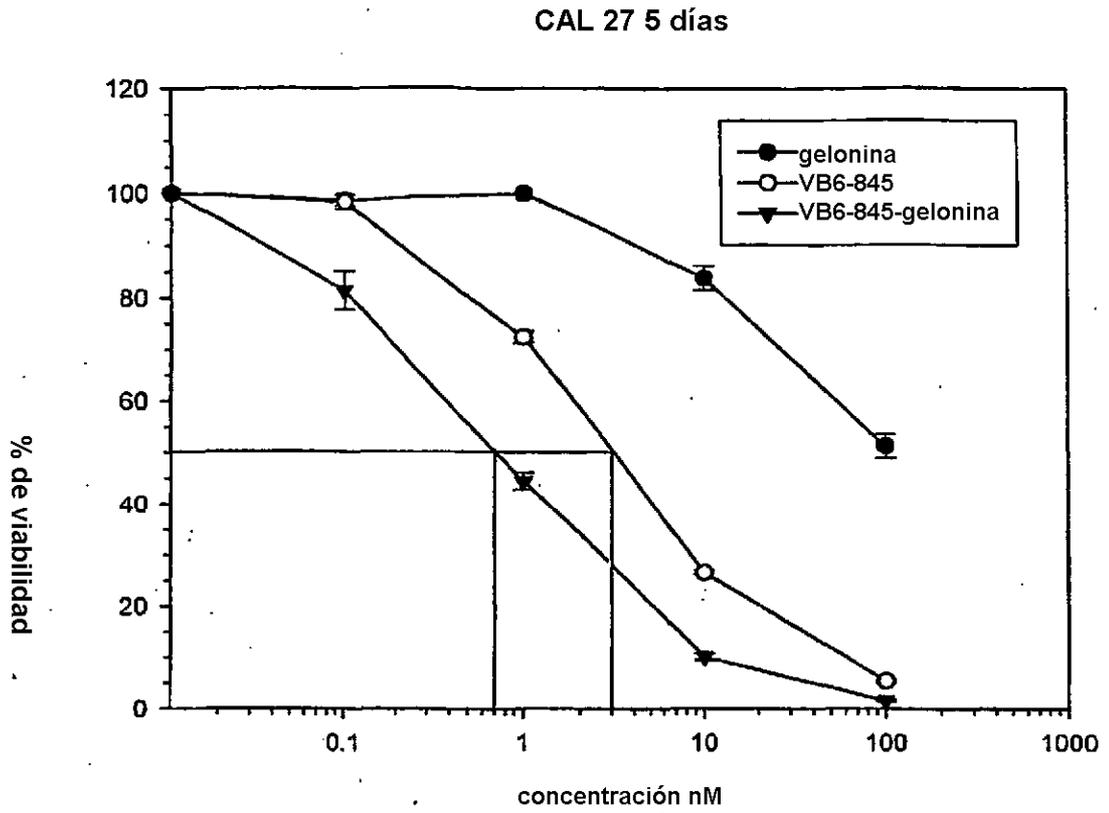
NIH:OVCAR-3 5 días



	CI₅₀
VB6-845	2-3 nM
VB6-845-CL-de-bouganina	0,6-0,7 nM
de-bouganina	30-35 nM

Citotoxicidad *in vitro* de VB6-845-CL-de-bouganina. Ensayo con MTS de VB6-845-CL-de-bouganina en comparación con VB6-845: se incubaron células NIH:OVCAR-3 con una concentración equimolar de VB6-845-CL-de-bouganina, VB6-845 y bouganina que variaba de 100 a 0,1 nM. Después de 5 días de incubación, se midió la viabilidad y se determinó el valor de CI₅₀.

FIGURA 13B

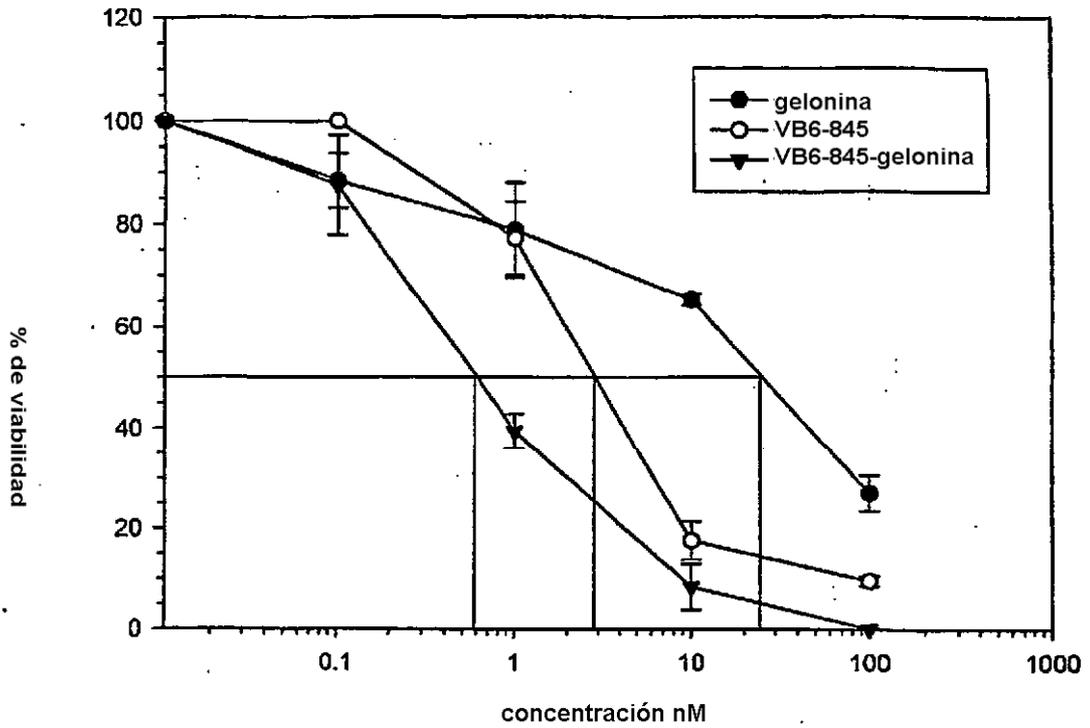


	CI_{50}
VB6-845	3 nM
VB6-845-gelonina	0,7 nM
gelonina	>100 nM

Citotoxicidad *in vitro* de VB6-845-gelonina. Ensayo con MTS de VB6-845-gelonina en comparación con VB6-845: se incubaron células CAL 27 con una concentración equimolar de VB6-845, VB6-845-gelonina y gelonina que variaba de 100 a 0,1 nM. Después de 5 días de incubación, se midió la viabilidad y se determinó el valor CI_{50} .

FIGURA 14A

NIH:OVCAR-3 5 días



	CI ₅₀
VB6-845	2-3 nM
VB6-845-gelonina	0,6 nM
gelonina	25 nM

Citotoxicidad *in vitro* de VB6-845-gelonina. Ensayo con MTS de VB6-845-gelonina en comparación con VB6-845: se incubaron células NIH:OVCAR-3 con una concentración equimolar de VB6-845, VB6-845-gelonina y gelonina que variaba de 100 a 0,1 nM. Después de 5 días de incubación, se midió la viabilidad y se determinó el valor de CI₅₀.

FIGURA 14B

VB6-845 Gelonina página 1 de 3

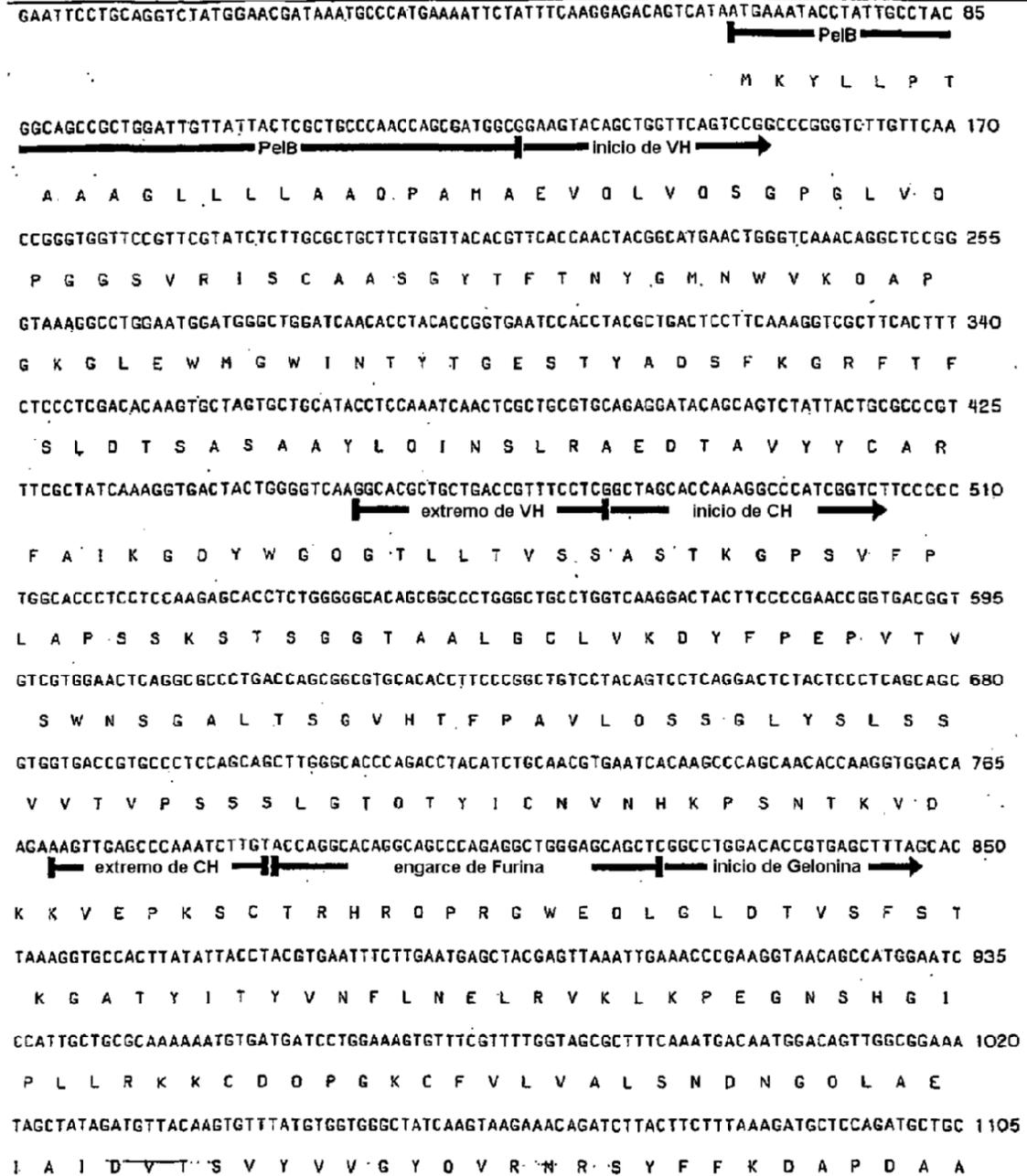


FIGURA 14C

VB6-846Gelonina página 2 de 3

TTACGAAGGCTCTTCAAAAACACAATTAACAAGACTTCATTTTGGCGGACGTATCCCTCGCTGGAAGGTGAGAAGGCATAT 1190
 Y E G L F K N T I K T R L H F G G S Y P S L E G E K A Y
 AGAGAGACAACAGACTTGGGCATTGAACCATTAAGGATTGGCATCAAGAACTTGATGAAAATGGGATAGACAATTATAAACCAA 1275
 R E T T D L G I E P L R I G I K K L D E N A I D N Y K P
 CGGAGATAGCTAGTTCTCTATTGGTTGTATTCAAATGGTGTCTGAAGCAGCTCGATTACCTTTATTGAGAACCAAATTAGAAA 1360
 T E I A S S L L V V I Q M V S E A A R F T F I E N O I R N
 TAACTTCAACAGAGAATCCGCCGACGAATAATACAATCAGCCTTGAGAATAAATGGGGTAACTCTCGTTCCAGATCCGGACA 1445
 N F D Q R I R P T N N T I S L E N K W G K L S F Q I R T
 TCAGGTGCAAAATGGAATGTTTTCBGAGGCAGTTGAATTGGAACGTGCAAAATGGCAAAAATACTATGTCACCGCAGTTGATCAAG 1530
 S G A N G M F S E A V E L E R A N G K K Y Y V T A V D Q
 TAAAACCCAAAATAGCACTCTTGAAGTTCGTCGATAAAGATCCTAAATAGTGATCTAGAGTCGACCTGCAGGTCTATGGAACGAT 1615
 ┌─────────── extremo de Gelonina ───────────┐
 V K P K I A L L K F V D K D P K . . .
 AAATGCCCATGAAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTACTCTG 1700
 ┌───┐ PeIB ──┐
 M K Y L L P T A A A G L L L L L
 CTGCCAACCCAGCGATGGCGCACCATCATCACCATCAGGATATCCAGATSAACCCAGTCCCGTCCCTCCCTGAGTGCCTTCTGTTGG 1785
 ┌────────── PeIB ───────────┐ ┌────────── 6xHis ───────────┐ ┌────────── inicio de VL ───────────┐
 A A Q P A M A H H H H H H D I Q M T Q S P S S L S A S V G
 TGACCGTGTACCATCACCTBCCGTTCCACCAAATCCCTCCTGCACCTCAACGGTATCACCTACCTTTATTGGTATCAACAGAAA 1870
 D R V T I T C R S T K S L L H S N G I T Y L Y W Y Q O K
 CCGGGTAAAGCTCCGAAACTTCTGATCTACCAGATGTCACACCTGGCTTCCGGTGTCCGCTCCTGTTTCTCCAGTTCTGGTTCTG 1955
 P G K A P K L L I Y Q M S N L A S G V P S R F S S S S G S
 GTACCGACTTCACCTGACCATCTCTTCTCTGCAGCCGGAAGACTTCGCTACCTACTACTGCGCTCAGAACCTGGAATCCCGCG 2040
 G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C A O N L E I P R
 TACCTTCGSTCAGGGTACCAAAGTTGAACTTAAGCGCACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCGCCATCTGATGAGCAG 2125
 ┌────────── extremo de VL ───────────┐ ┌────────── inicio de CL ───────────┐
 T F G Q G T K V E L K R T V A A P S V F I F P P S D E Q
 TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACG 2210
 L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N
 CCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA6CCTCAGCAGCACCTGACGCT 2295
 A L O S G N S O E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L

FIGURA 14C CONT.

GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTEGGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCTCACAAAGAGCTTC 2380
S K A D Y E K H K V Y A C E V T H D G L S S P V T K S F

AACAGGGGAGAGTGTAGTAGCTCGAG 2407
[] extremo de CL []
N R G E C . . .

FIGURA 14C CONT.

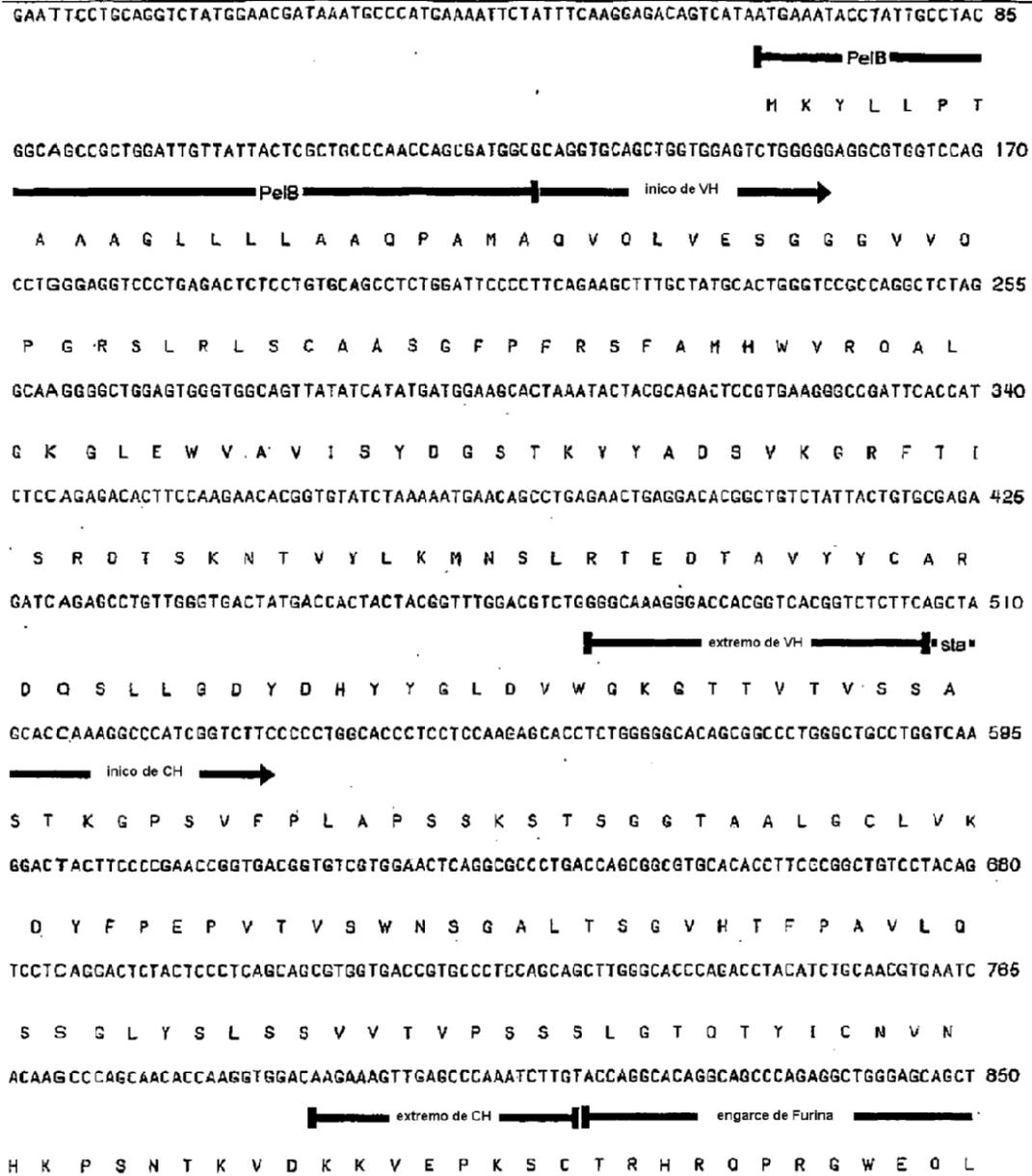
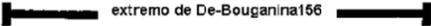


Figura 15

CTACAACACCGTGTCATTTAACCTTGGAGAAGCTTATGAGTACCCCACTTTTATACAAGATTTGCCAATGAATTGGCTAAGGGC 935

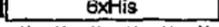
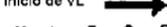

 inicio de De-Bouganina156

Y N T V S F N L G E A Y E Y P T F I O D L R N E L A K G
 ACACCAGTATGTCAACTTCCAGTGACACTACAAACCATAGCCGATGACAAGCGATTGTCTAGTTGATATCACTACGACCTCGA 1020
 T P V C O L P V T L Q T I A D D K R F V L V D I T T T S
 AGAAAACAGTTAAGSTTGTATAGATGTGACAGATGTGTATGTTGTGGGTTATCAAGACAAATGGGATGGCAAAGATCGAGCTGT 1105
 K K T V K V A I D V T D V Y V V G Y O D K W D G K D R A V
 TTTCCCTGACAAGSTTCTACTGTTGCAACTAGTAAACTTTTCCAGGGGTGACTAATCGTGAACGTTAACATTTGATGGCAGC 1190
 F L D K V P T V A T S K L F P G Y T N R V T L T F D G S
 TATCAGAACTTGTGAATGCTGCCAAAGCTGATAGAAAGGCTCTCGAACTGGGGGTTAACAAATTGGAATTTCCATTGAAGCAA 1275
 Y Q K L V N A A K A D R K A L E L G V N K L E F S I E A
 TCCATGGTAAACGATAAATGGTCAAGAGGCAGCCAAGTCTTCTTATTGTATCCAAATGGTTTCAGAGGCAGCTCGGTTCAA 1360
 I H G K T I N G Q E A A K F F L I V I O M V S E A A R F K
 ATATATTGAGACTGAGGTGGTTGATAGAGGATTATATGGATCATTCAAACCTAATTTTAAAGTATTGAACTTGGAGAACAATTGG 1445
 Y I E T E V V D R G L Y G S F K P N F K V L N L E N N W
 GGGACATCTCTGATGCCATTCACAAATCATCCCCACAATGTACCCTATTAATCCGGCACTTCAGTTGATAAGCCCCCTCAAATG 1530
 G D I S D A I H K S S P Q C T T I N P A L Q L I S P S N
 ACCCATGGGTTGTAAATAAAGTGAGTCAAATTAGTCCCGATATGGGTATCCTTAAGTTTAAAGCTCCAAATAGTGATCTAGAGT 1615

 extremo de De-Bouganina156

D P W V V N K V S D I S P D M G I L K F K S S K
 CGACCTGCAGGTCTATGGAACGATAAATGCCCATGAAAATTCTATTTCAAGGAGACAGTCATAATGAAATACCTATTGCCTACGG 1700

 PeIB
 M K Y L L P T

CABCCGCTGGATTGTTACTCGCTGCCCAACCAGCGATGGGGCATCACCATCACCATCAGATATCGTGTGACGCGAGTCTCC 1785

 PeIB
 
 exHis
 
 inicio de VL

A A A G L L L L A A Q P A M A H H H H H H D I V L T O S P

Figura 15 (Cont.)

AGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGCAGCTACTTAGCCTGG 1870
 G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W

TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGCATGCCAGACAGGTTCAAGT 1955
 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S T R A T G M P D R F S

GCAGTGGGTCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGTAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCCAGCAGTATGG 2040
 G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G

TAGCTCACCTCAGACACCTCAGATCACTTTCGGCGGAGGBACCAAGGTGGAGATCAAACGAACGTGGCTGCACCATCTGTCTTC 2125
 S S P Q T P Q I T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F


ATCTTCCCGCCATCTBATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTBCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA 2210
 I F P P S D E O L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A

AGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA 2295
 < V Q W K V D N A L O S G N S O E S V T E Q D S K D S T Y

DAGCETCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG 2380
 S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L

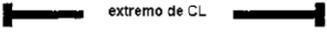
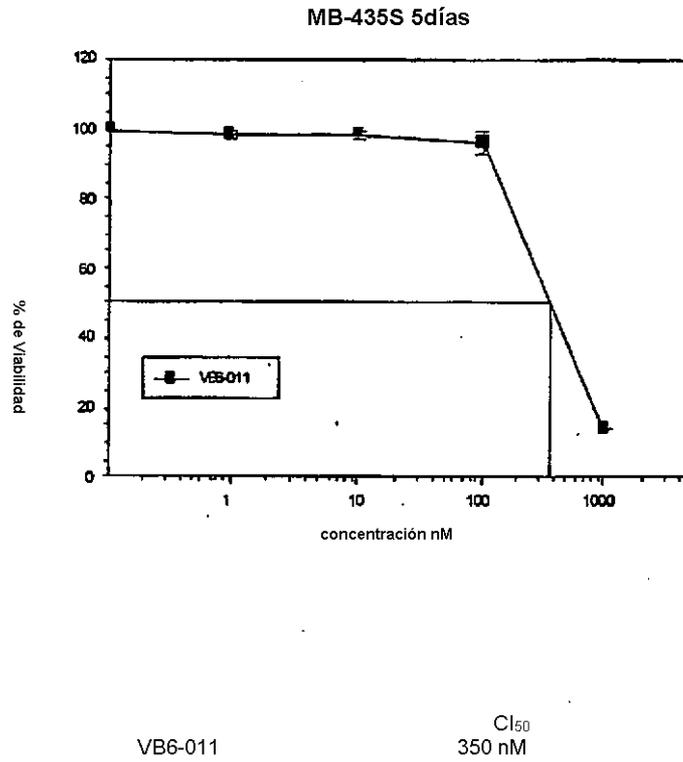
AGCTGCCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGTACTCGAG 2431
 S S P V T K S F N R G E C . .


Figura 15 (Cont.)



Citotoxicidad *in vitro* de VB6-011. Ensayo con MTS de VB6-011: se incubaron células MB-435S con diferentes concentraciones de VB6-011 que variaban de 100 nM a 1 nM. Después de 5 días de incubación, se midió la viabilidad y se determinó el valor CI₅₀.

Figura 16