

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 816**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/485** (2006.01)

**C07K 14/33** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2009 E 09785502 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2326665**

54 Título: **Proteínas de fusión no citotóxicas que comprenden muteínas de EGF**

30 Prioridad:

**21.08.2008 GB 0815264**

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

**07.01.2014**

73 Titular/es:

**SYNTAXIN LIMITED (100.0%)  
Units 4-10 The Quadrant Barton Lane  
Abingdon Oxfordshire OX14 3YS, GB**

72 Inventor/es:

**COSSINS, AIMEE;  
BIRCH-MACHIN, IAN;  
STANCOMBE, PATRICK;  
CHADDOCK, JOHN y  
BEARD, MATTHEW**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 436 816 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 de fusión no citotóxicas que comprenden muteínas de EGF.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a proteínas de fusión no citotóxicas, y al uso de las mismas con productos terapéuticos para suprimir afecciones tales como hipersecreción de mucus, inflamación, trastornos neuroendocrinos y tumores neuroendocrinos.
- 10 **[0002]** Las proteasas no citotóxicas son un grupo discreto de proteasas, que actúan sobre las células dianas incapacitando la función celular. De manera importante, las proteasas no citotóxicas no destruyen las células diana sobre las que actúan. Algunos de los mejores ejemplos conocidos de las proteasas no citotóxicas incluyen neurotoxinas clostridiales y proteasas de IgA.
- 15 **[0003]** Las proteasas no citotóxicas actúan escindiendo de forma proteolítica las proteínas de transporte intracelular conocidas como proteínas SNARE (por ejemplo, SNAP-25, VAMP o Sintaxina)- véase Gerald K (2002) "Cell and Molecular Biology" (4ª edición) John Wiley & Sons, Inc. El acrónimo SNARE deriva del término receptor de unión a la NSF soluble (*Soluble NSF Attachment Receptor*), donde NSF significa factor sensible a la N-etil-maleimida (*N-ethyl-maleimide-Sensitive Factor*). Las proteínas SNARE son esenciales para la formación de vesículas intracelulares y, por lo tanto, para la secreción de moléculas a través del transporte de vesículas de una célula. Por  
20 consiguiente, una vez administrada una célula diana deseada, la proteasa no citotóxica es capaz de inhibir la secreción celular de la célula diana.
- [0004]** En vista de la naturaleza omnipresente de las proteínas SNARE, las proteasas no citotóxicas se han empleado con éxito en una gran diversidad de terapias, tales como: el tratamiento del dolor (véase el documento  
25 WO96/33274); el tratamiento de afecciones relacionadas con la hipersecreción de mucus, tales como EPOC, asma (véase el documento WO00/10598); el tratamiento de afecciones no neuronales, tales como afecciones endocrinas, afecciones exocrinas, afecciones inmunológicas, afecciones cardiovasculares, afecciones óseas (véase el documento WO01/21213); el tratamiento de trastornos neurológicos, tales como la enfermedad de Parkinson (véanse los documentos US 6.620.415, US 6.306.403); el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos (véanse los  
30 documentos US2004/0180061, US2003/0211121); el tratamiento de trastornos endocrinos (véase el documento US 6.827.931); el tratamiento de trastornos tiroideos (véase el documento US 6.740.321); el tratamiento de la diabetes (véanse los documentos US 6.337.075, US 6.416.765); y el tratamiento de trastornos pancreáticos (véanse los documentos US 6.261.572, US 6.143.306).
- 35 **[0005]** El documento US2008/032928 describe el tratamiento de la hipersecreción de mucus, composiciones para la misma y la fabricación de las composiciones. Se hace referencia particular al tratamiento de bronquitis crónica en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma y otras afecciones clínicas que implican EPOC.
- [0006]** Foster K A, y col. (2006) "Re-engineering the target specificity of Clostridial neurotoxins - a route to novel  
40 therapeutics" describen la producción de una proteína de fusión completamente recombinante de un gen recombinante que codifica tanto el dominio LH<sub>N</sub> de una neurotoxina clostridial y un dominio diana específico, junto con la capacidad de dichas proteínas de fusión recombinantes de inhibir la secreción de células diana no neuronales.
- 45 **[0007]** El documento US 2008/038274 describe el tratamiento de una enfermedad mediante la inhibición de procesos secretores celulares, agentes y composiciones para la misma, y la fabricación de estos agentes y composiciones. Se hace referencia particular al tratamiento de una enfermedad dependiente de la actividad  
50 excitotóxica de células endocrinas, células exocrinas, células inflamatorias, células del sistema inmune, células del sistema cardiovascular y células óseas.
- [0008]** Generalmente, se tolera bien la administración de una proteasa no citotóxica. Sin embargo, la administración en algunos casos puede ser difícil debido a que se requieren dosis mayores para conseguir un efecto  
55 beneficioso. Las dosis más grandes pueden aumentar la probabilidad de respuestas antigénicas no deseadas. De forma análoga, las dosis mayores están asociadas a un aumento del coste de fabricación.
- [0009]** En común con otras sustancias medicamentosas, existe un intervalo de dosificación terapéutica que identifica los límites inferiores y superiores de una terapia segura y eficaz. A menudo, el límite superior se determina por la importancia creciente de los efectos inespecíficos que conducen a efectos secundarios indeseables (por ejemplo potencialmente dañinos) del tratamiento farmacológico. En el caso de proteasas no citotóxicas, esto podría

conducir a la parálisis de la secreción celular en las células inespecíficas, lo que, a su vez, puede ser fatal.

**[0010]** El uso de moléculas de proteasa no citotóxica en tratamientos terapéuticos de seres humanos y otros mamíferos está atrayendo cada vez mayor interés. A este respecto, un área de enfoque de interés radica en el uso de proteasas no citotóxicas re-dirigidas al factor de crecimiento epidérmico (EGF). Se ha demostrado que estos productos terapéuticos son útiles en la reducción de la secreción de mucus (véase el documento WO00/10598), y la inflamación (véase el documento US11/806.648). Los presentes inventores también han descubierto que las proteasas no citotóxicas re-dirigidas a EGF son útiles en la supresión de trastornos neuroendocrinos y tumores neuroendocrinos.

**[0011]** Sin embargo, un problema asociado a la aplicación terapéutica de las proteasas no citotóxicas basadas en EGF es que la eficacia puede requerir el uso de niveles de dosificación relativamente altos. Como se ha mencionado anteriormente, esto es deseable para esto no es deseable debido al aumento de los costes de fabricación y/o problemas potenciales de inmunogenicidad.

**[0012]** Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de desarrollar medios para reducir tamaños de dosificación y/o para reducir respuestas antigénicas no deseables, mientras que se mantiene la potencia de la proteasa no citotóxica. Esta necesidad se ve exacerbada por el uso creciente de las proteasas no citotóxicas, que tiene en cuenta una necesidad creciente por parte de la industria farmacéutica de desarrollar moléculas terapéuticas alternativas y/o mejoradas.

**[0013]** La presente invención aborda la necesidad o necesidades anteriores, y resuelve uno o más de los problemas que se han mencionado anteriormente. En más detalle, la presente invención proporciona proteasas no citotóxicas re-dirigidas a EGF alternativas y/o mejoradas, que son útiles para diversas aplicaciones clínicas y terapéuticas, en particular para el tratamiento de la inflamación, los trastornos relacionados con la secreción de mucus, tales como asma y EPOC, así como trastornos neuroendocrinos y tumores neuroendocrinos.

**[0014]** En más detalle, un primer aspecto de la presente invención proporciona un polipéptido, como se define en las reivindicaciones.

**[0015]** Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores creen que el EGF se une a su receptor natural (es decir, el receptor del EGF; también conocido como ErbB<sub>1</sub> a través de una reacción de unión, que implica dos interfaces de unión distintas presentes en la molécula de EGF, concretamente una primera interfaz de unión (es decir, Interfaz de Unión 1) proporcionada por la secuencia de residuos aminoacídicos en las posiciones 31-40 de SEQ ID NO: 1, y una segunda interfaz de unión (es decir, Interfaz de Unión 2) proporcionada por la secuencia de residuos aminoacídicos en las posiciones 41-45 de SEQ ID NO: 1. Se cree que estas dos Interfaces de Unión se unen a cada lado de una hendidura, que está presente en el receptor del EGF, y en el que después se inserta una pequeña porción (denominada como Extremo de Avance) de la molécula del EGF. El Extremo de Avance se proporciona por la secuencia de residuos aminoacídicos en las posiciones 48-51 de SEQ ID NO: 1 e incluye una secuencia de soporte estructural proporcionada por las posiciones 15-17 de SEQ ID NO: 1. Esta disposición de unión se ilustra en la figura 2, en la que la hendidura con forma de U del receptor se sitúa en la parte superior y a la izquierda de la figura 2 y la cara "abierta" de los puntos de hendidura hacia el centro de la figura 2.

**[0016]** En más detalle, los presentes inventores creen que los residuos aminoacídicos "voluminosos" presentes en el Extremo de Avance (posiciones 15-17 y 48-51 de SEQ ID NO: 1) del EGF reducen la capacidad de activación del receptor del EGF de las moléculas de fusión no citotóxicas basadas en EGF. Por lo tanto, reduciendo el tamaño total de los residuos aminoacídicos presentes en el Extremo de Avance, los presentes inventores ha proporcionado una nueva muteína del EGF, que confiere mejores propiedades de activación del receptor en las moléculas de fusión no citotóxicas del EGF de la presente invención en comparación con las fusiones del EGF de tipo natural correspondientes.

**[0017]** La muteína del EGF puede modificarse (en comparación con la SEQ ID NO: 1) por la sustitución o delección de uno o más residuos aminoacídicos "voluminosos" presentes en el Extremo de Avance, en el que dichos residuos aminoacídicos "voluminosos" se seleccionan entre fenilalanina (F), triptófano (W) o tirosina (Y). A modo de ejemplo, las sustituciones adecuadas pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: leucina (L), isoleucina (I), valina (V), alanina (A), glicina (G), serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q) y metionina (M). En una realización preferida, dicha sustitución o delección es en las posiciones 48-51, preferiblemente en la posición 49 y/o la posición 50 (en comparación con la SEQ ID NO: 1). A este respecto, la posición 49 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con leucina (L), isoleucina (I) o valina (V), preferiblemente con leucina (L); y/o

la posición 50 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con alanina (A), glicina (G), serina (S), treonina (T) o metionina (M), preferiblemente con alanina (A).

**[0018]** La muteína del EGF puede modificarse por separado o adicionalmente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) por la sustitución o delección de uno o más residuos aminoacídicos presentes en las posiciones 15-17 del Extremo de Avance. Se cree que las modificaciones dentro de esta región aumentan la estabilidad del Extremo de Avance, por ejemplo, mediante la introducción de uno o más enlaces hidrógeno inter- o intra-moleculares adicionales. A modo de ejemplo, las sustituciones adecuadas pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: asparagina (N), glutamina (Q), aspartato (D), cisteína (C), glicina (G), leucina (L), serina (S), treonina (T), valina (V), triptófano (W) y tirosina (Y). A este respecto, la posición 16 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con asparagina (N) o glutamina (Q).

**[0019]** Además de las modificaciones del Extremo de Avance que se ha descrito anteriormente, la muteína del EGF puede modificarse adicionalmente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) por la sustitución o delección de uno o más residuos aminoacídicos presentes en las posiciones 23-29. Estas posiciones están cerca de la Interfaz de Unión 1 (que se ha analizado anteriormente), y ayudan a proporcionar estabilidad adicional a la muteína del EGF. A modo de ejemplo, las sustituciones adecuadas pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), metionina (M), arginina (R), lisina (K) e histidina (H). A este respecto, las sustituciones preferidas se introducen en una o más de las posiciones 24-28. Por ejemplo, la posición 24 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T) o metionina (M), preferiblemente con glicina (G); y/o la posición 25 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con treonina (T), glicina (G), alanina (A), serina (S) o metionina (M), preferiblemente con treonina (T); y/o la posición 28 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con arginina (R), lisina (K) o histidina (H), preferiblemente con arginina (R).

**[0020]** Además de las modificaciones del Extremo de Avance que se han descrito anteriormente, y opcionalmente además de la modificación que se ha descrito anteriormente en la posición 23-29, la muteína del EGF puede modificarse adicionalmente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) por la sustitución o delección de uno o más residuos aminoacídicos presentes en las posiciones 3-5. Estas posiciones están cerca de donde la muteína del EGF se fusiona típicamente al cuerpo mayor de la proteína de fusión, y ayudan a proporcionar una estabilidad adicional a la muteína del EGF. A modo de ejemplo, las sustituciones adecuadas pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: prolina (P), arginina (R), lisina (K) e histidina (H). A este respecto, la posición 4 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con prolina (P), y/o la posición 5 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con arginina (R), lisina (K) o histidina (H), preferiblemente lisina (K).

**[0021]** Además de las modificaciones del Extremo de Avance que se han descrito anteriormente, y opcionalmente además de la modificación que se ha descrito anteriormente en la posición 23-29 y/o las posiciones 3-5, la muteína del EGF puede modificarse adicionalmente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) por la sustitución o delección de uno o más residuos aminoacídicos presentes en las posiciones 10-12. Estas posiciones están cerca de donde la muteína del EGF se fusiona típicamente al cuerpo mayor de la proteína de fusión, y ayudan a proporcionar una estabilidad adicional a la muteína del EGF. A modo de ejemplo, las sustituciones adecuadas pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: ácido glutámico (E) y ácido aspártico (D). A este respecto, la posición 11 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con ácido glutámico (E) o ácido aspártico (D), preferiblemente con ácido glutámico.

**[0022]** Además de las modificaciones del Extremo de Avance que se han descrito anteriormente, y opcionalmente además de la modificación que se ha descrito anteriormente en la posición 23-29 y/o las posiciones 3-5 y/o las posiciones 10-12, la muteína del EGF puede modificarse adicionalmente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) por la sustitución o delección de uno o más residuos aminoacídicos presentes en las posiciones 37-39. Estas posiciones están cerca tanto de la Interfaz de Unión 1 como de la Interfaz de Unión 2 (que se han analizado anteriormente), y ayudan a proporcionar una estabilidad adicional a la muteína del EGF. A modo de ejemplo, las sustituciones adecuadas pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en: valina (V), leucina (L) e isoleucina (I). A este respecto, la posición 38 está sustituida preferiblemente (en comparación con la SEQ ID NO: 1) con valina (V), leucina (L) o isoleucina (I), preferiblemente con valina (V).

**[0023]** Los presentes inventores han señalado que la capacidad de activación de una molécula de EGF (para su receptor de EGF natural) se reduce de forma significativa cuando la molécula de EGF está presente como parte de una proteína de fusión mucho más grande, como es el caso cuando una molécula de este tipo se usa como un

Resto Diana en una proteína de fusión no citotóxica. Este problema se aborda por la presente invención mediante la introducción de una o más mutaciones, que aumentan la capacidad de activación de dicha molécula de EGF cuando está presente como parte de una proteína de fusión no citotóxica mayor. A su vez, esto mejora la eficacia de búsqueda de dianas celulares de los polipéptidos de la presente invención, y significa que pueden emplearse regímenes de dosificación inferiores. Lo último reduce el coste de fabricación y minimiza los efectos antigénicos relacionados con el paciente no deseables frente a los polipéptidos de la invención.

5 **[0024]** Es habitual confirmar que una muteína del EGF ha mejorado la capacidad de activación para un receptor del EGF (por ejemplo ErbB); a modo de ejemplo, se hace referencia a los Ejemplos 4 y 5.

10 **[0025]** Las fusiones de EGF pueden demostrar una afinidad de unión a un receptor del EGF (por ejemplo ErbB<sub>1</sub>) que es superior a 4 ó 2 nM, o superior a 0,4 ó 0,2 nM, o superior a 0,04 ó 0,02 nM.

15 **[0026]** Como alternativa, las fusiones de EGF pueden demostrar una activación de unión de un receptor del EGF (por ejemplo ErbB<sub>1</sub>) que es superior a 6 pEC<sub>50</sub>, o superior a 7 pEC<sub>50</sub>, o superior a 8 pEC<sub>50</sub>. Se proporcionan ejemplos de ensayos adecuados en los Ejemplos 9 y 10.

20 **[0027]** La muteína del EGF comprende al menos una delección, sustitución o inserción aminoacídica *vis-a-vis* el EGF humano de origen natural (SEQ ID NO: 1), aunque con la condición de que ninguno de los 6 residuos aminoacídicos de cisteína del EGF humano de origen natural esté alterado de tal modo. De dichas modificaciones, las sustituciones son las más preferidas, ya que tienen menos efecto sobre la estructura secundaria o terciaria.

25 **[0028]** La muteína del EGF puede diferir del EGF humano de origen natural en que comprende al menos una (o más, como se ha detallado anteriormente) delección, sustitución o inserción en cualquiera de las posiciones: D<sub>3</sub>S<sub>4</sub>E<sub>5</sub>, P<sub>7</sub>L<sub>8</sub>S<sub>9</sub>, G<sub>12</sub>Y<sub>13</sub>, L<sub>15</sub>H<sub>16</sub>, M<sub>21</sub>Y<sub>22</sub>I<sub>23</sub>E<sub>24</sub>A<sub>25</sub>, I<sub>38</sub>G<sub>39</sub>E<sub>40</sub>R<sub>41</sub>, Q<sub>43</sub>Y<sub>44</sub>R<sub>45</sub>D<sub>46</sub>L<sub>47</sub>K<sub>48</sub>W<sub>49</sub>W<sub>50</sub>E<sub>51</sub>L<sub>52</sub> (las posiciones y las letras se refieren al código aminoacídico de una letra del EGF humano de origen natural - SEQ ID NO: 1).

30 **[0029]** Por ejemplo: D<sub>3</sub> puede estar sustituido con G, N, Y, A o F; S<sub>4</sub> puede estar sustituido con T, P, F, Q o R; E<sub>5</sub> puede estar sustituido con G, K o Q, P<sub>7</sub> puede estar sustituido con S, L<sub>8</sub> puede estar sustituido con P, S, R o Q; S<sub>9</sub> puede estar sustituido por P; G<sub>12</sub> puede estar sustituido con E, D o Q; Y<sub>13</sub> puede estar sustituido con H o W; L<sub>15</sub> puede estar sustituido por A, I, M, F o V; H<sub>16</sub> puede estar sustituido con Q, N, A, E, D o Y, M<sub>21</sub> puede estar sustituido con V, R o K; Y<sub>22</sub> puede estar sustituido con H, I<sub>23</sub> puede estar sustituido con V o L; E<sub>24</sub> puede estar sustituido con K, G o V; A<sub>25</sub> puede estar sustituido con S, T o Q; I<sub>38</sub> puede estar sustituido con T, S, A, N, L o V; G<sub>39</sub> puede estar sustituido con E, Q, K, D, I, L o F; E<sub>40</sub> puede estar sustituido con D; R<sub>41</sub> puede estar sustituido por D; Q<sub>43</sub> puede estar sustituido con E; Y<sub>44</sub> puede estar sustituido con H o T; R<sub>45</sub> puede estar sustituido por G, Q o P; R<sub>46</sub> puede estar sustituido por G; L<sub>47</sub> puede estar sustituido por G, D o R; K<sub>48</sub> puede estar sustituido con R, T o D; W<sub>49</sub> puede estar sustituido por R; W<sub>50</sub> puede estar sustituido por L; E<sub>51</sub> puede estar sustituido por G, A, W, K o Y; y/o L<sub>52</sub> puede estar sustituido por P, R o T.

40 **[0030]** Además o por separado, Q<sub>18</sub> puede estar sustituido con E, Q, K, F o L; y/o V<sub>35</sub> puede estar sustituido con E; D<sub>17</sub> puede estar sustituido por G; V<sub>19</sub> puede estar sustituido por A.

45 **[0031]** Además o por separado, N<sub>1</sub> puede estar sustituido por S, K, Y, T o H; S<sub>2</sub> puede estar sustituido por G o R; E<sub>5</sub> puede estar sustituido por G o K; H<sub>10</sub> puede estar sustituido por Y; D<sub>11</sub>, puede estar sustituido por N, S o E; L<sub>26</sub> puede estar sustituido por V; K<sub>28</sub> puede estar sustituido por R, S o T; A<sub>30</sub> puede estar sustituido por V; N<sub>32</sub> puede estar sustituido por S; V<sub>34</sub> puede estar sustituido por A; V<sub>35</sub> puede estar sustituido por A.

50 **[0032]** La muteína del EGF puede diferir del EGF humano de origen natural en que comprende al menos una (o más, como se ha detallado anteriormente) delección, sustitución o inserción en cualquiera de las posiciones G<sub>12</sub>Y<sub>13</sub>, H<sub>16</sub> (las posiciones y las letras se refieren al código aminoacídico de una letra del EGF humano de origen natural - SEQ ID NO: 1). A modo de ejemplo, G<sub>12</sub> puede estar sustituido por un residuo aminoacídico, tal como glutamina (Q) o asparagina (N). De forma análoga, Y<sub>13</sub> puede estar sustituido por un residuo tal como triptófano (W) o fenilalanina (F), y H<sub>16</sub> puede estar sustituido por un residuo tal como ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), glicina (G), alanina (A), serina (S) o treonina (T).

55 **[0033]** En una realización, la muteína del EGF comprende una secuencia aminoacídica como se indica en la SEQ ID NO: 11. Esta realización incluye variantes de la misma que tienen al menos el 95% o al menos el 97% de identidad de secuencia con respecto a la misma, aunque con la condición de que dichas variantes siempre retengan la sustitución o sustituciones aminoacídicas específicas ilustradas en dichas SEQ ID NO en comparación con el EGF

humano de tipo natural (es decir, la SEQ ID NO: 1). Esta realización también incluye variantes de la misma que tienen al menos el 95% o al menos el 97% de identidad de secuencia con respecto a la misma, aunque con la condición de que dichas variantes siempre retengan una sustitución aminoacídica conservativa de la sustitución o sustituciones aminoacídicas específicas ilustradas en dicha SEQ ID NO: 11 en comparación el EGF humano de tipo natural (es decir, la SEQ ID NO: 1).

5 **[0034]** El componente biológicamente activo de los polipéptidos de la presente invención es una proteasa no citotóxica. Las proteasas no citotóxicas se producen por una diversidad de plantas, y por una diversidad de microorganismos, tales como clostridial sp. y neisserial sp. (por ejemplo, *N. gonorrhoeae*).

10 **[0035]** En una realización preferida, la proteasa no citotóxica de la presente invención es una proteasa de neurotoxina clostridial o una proteasa de IgA neisseriana.

15 **[0036]** Volviendo ahora al péptido de translocación (también denominado como el dominio de translocación) de la presente invención, este componente sirve para translocar la proteasa no citotóxica a través de la membrana endosómica y en el citosol de una célula diana, donde el componente de la proteasa puede entonces ejercer su efecto proteolítico sobre las proteínas SNARE. Los péptidos de translocación se conocen bien en la técnica, y se producen por una diversidad de plantas y microorganismos.

20 **[0037]** En una realización preferida, el péptido de translocación de la presente invención es un péptido de translocación de la neurotoxina clostridial (también conocido como un dominio de translocación clostridial, o H<sub>N</sub>).

25 **[0038]** El polipéptido de la presente invención comprende una molécula de EGF modificada, que actúa como un Resto Diana (RD) para dirigir el polipéptido a una célula o células diana seleccionadas, por ejemplo, mediante unión a un receptor del EGF en una célula secretora de mucus. En una realización preferida, el receptor del EGF es un receptor ErbB, preferiblemente un receptor ErbB<sub>1</sub>.

30 **[0039]** De acuerdo con un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido no citotóxico (como se define en las reivindicaciones), para su uso en el tratamiento de una variedad de afecciones y enfermedades médicas.

35 **[0040]** En una realización, la presente invención proporciona el uso de dichos polipéptidos no citotóxicos y los procedimientos correspondientes para la supresión de la hipersecreción de mucus, en particular afecciones o enfermedades en las que la hipersecreción de mucus es un elemento causante, tal como bronquitis (crónica), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y asma.

**[0041]** En una realización, la presente invención proporciona el uso y los procedimientos correspondientes para la supresión de la inflamación.

40 **[0042]** En otra realización, la presente invención proporciona el uso y los procedimientos correspondientes para la supresión de una neoplasia endocrina, tal como NEM, tirotoxicosis y trastornos neuroendocrinos, tal como enfermedad de Cushing, acromegalia, hiperandrogenismo, anovulación crónica, síndrome de ovario poliquístico, síndrome carcinoide, síndrome hipoglucémico, eritema migratorio necrolítico, síndrome de Zollinger-Ellison y síndrome de Verner-Morrison.

45 **[0043]** En una realización, la presente invención proporciona el uso y los procedimientos correspondientes para la supresión de tumores neuroendocrinos, tales como tumores neuroendocrinos gastroenteropancreáticos no carcinoides, tumores carcinoides, tumores pituitarios y feocromocitomas, y para la supresión de cánceres, tales como cáncer colorectal, cáncer de próstata, cáncer de mama y cáncer de pulmón.

50 **[0044]** Durante el uso, un polipéptido de la invención se une a un receptor del EGF (por ejemplo ErbB) (el Sitio de Unión), que está presente en y es preferiblemente característico de una célula diana. Por lo tanto, en el contexto de aplicaciones de mucus, el TM del EGF se une a las células secretoras de mucus (por ejemplo, células calciformes epiteliales, o células secretoras de mucus de las glándulas de la submucosa). En el contexto de aplicaciones antiinflamatorias, el TM del EGF se une a las células leucocitarias inflamatorias (por ejemplo neutrófilos). En el contexto de las afecciones neuroendocrinas, el TM del EGF puede unirse a la propia célula tumoral, o a una célula secretora de hormonas del crecimiento (por ejemplo, una célula pituitaria). Tras la unión, el polipéptido de la invención (al menos el componente de la proteasa no citotóxica del mismo) se endocita en una vesícula, y el componente de translocación entonces dirige el transporte de la proteasa no citotóxica a través de la membrana

endosómica y en el citosol de la célula diana. Una vez dentro de la célula diana, el componente de la proteasa no citotóxica inhibe el proceso de fusión exocítica celular, y así inhibe la liberación/secreción de la célula diana.

### Preparación de polipéptidos

5

**[0045]** Los polipéptidos de la presente invención comprenden 3 componentes principales: una "ojiva" (es decir, una proteasa no citotóxica); un RD de muteína del EGF; y un dominio de translocación. La tecnología general asociada a la preparación de tales proteínas de fusión se denomina frecuentemente tecnología de toxina re-elegida como diana.

A modo de ejemplificación, los presentes inventores se refieren a: documentos WO94/21300; WO96/33273; 10 WO98/07864; WO00/10598; WO01/21213; WO06/059093; WO00/62814; WO00/04926; WO93/15766; WO00/61192; y WO99/58571.

**[0046]** En más detalle, el componente de RD de la presente invención puede fusionarse con tanto el componente de proteasa como el componente de translocación de la presente invención. Dicha fusión es preferiblemente a modo 15 de un enlace covalente, por ejemplo, tanto un enlace covalente directo como mediante una molécula de separador/enlazador. El componente de proteasa y el componente de translocación se ligan preferiblemente juntos mediante un enlace covalente, por ejemplo, tanto un enlace covalente directo como mediante una molécula de separador/enlazador. Las moléculas de separador/enlazador adecuadas se conocen bien en la técnica, y normalmente comprenden una secuencia basada en aminoácidos de entre 5 y 40, preferiblemente entre 10 y 30 20 residuos de aminoácidos de longitud.

**[0047]** Durante el uso, los polipéptidos tienen una conformación de di-cadena en la que el componente de proteasa y el componente de translocación están ligados juntos, preferiblemente mediante un enlace disulfuro.

25 **[0048]** Los polipéptidos de la presente invención pueden prepararse por técnicas de conjugación química convencionales, que se conocen bien por un experto. A modo de ejemplo se hace referencia a Hermanson, G.T. (1996), Bioconjugate techniques, Academic Press, y a Wong, S.S. (1991), Chemistry of protein conjugation and cross-linking, CRC Press.

30 **[0049]** Como alternativa, los polipéptidos pueden prepararse por preparación recombinante de una proteína de fusión de un único polipéptido (véase, por ejemplo, el documento WO98/07864). Esta técnica se basa en el mecanismo bacteriano *in vivo* por el que se prepara la neurotoxina clostridial nativa (es decir, holotoxina), y produce una proteína de fusión que tiene la siguiente disposición estructural "simplificada":

35 
$$\text{NH}_2\text{-[componente de proteasa]-[componente de translocación]-[RD EGF]-COOH}$$

**[0050]** De acuerdo con el documento WO98/07864, el RD está dispuesto hacia el extremo C de la proteína de fusión. La proteína de fusión se activa entonces mediante tratamiento con una proteasa, que se escinde en un sitio 40 entre el componente de proteasa y el componente de translocación. Así se produce una proteína de di-cadena que comprende el componente de proteasa como una cadena de un único polipéptido covalentemente unida (mediante un puente disulfuro) a otra cadena de un único polipéptido que contiene el componente de translocación más RD.

**[0051]** Como alternativa, las proteínas de fusión de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con el documento WO06/059093, de tal forma que el RD tiene un dominio Terminal N que no interacciona con un Sitio de 45 Unión en una célula diana. En este sistema, el componente RD de la proteína de fusión se sitúa hacia el centro de la secuencia de la proteína de fusión lineal, entre el sitio de escisión de proteasa y el componente de translocación. La posterior escisión en el sitio de escisión por proteasa expone la porción del extremo N del RD, y proporciona la proteína de fusión de polipéptidos de di-cadena.

50 **[0052]** La secuencia o las secuencias de escisión por proteasa que se han mencionado anteriormente pueden introducirse (y/o eliminarse cualquier secuencia de escisión inherente) al nivel de ADN mediante medios convencionales, tales como por mutagénesis dirigida a sitio. El cribado para confirmar la presencia de secuencias de escisión puede realizarse manualmente o con la ayuda de software informático (por ejemplo, el programa MapDraw de DNASTAR, Inc.). Aunque puede emplearse cualquier sitio de escisión por proteasa (es decir, clostridial, o no 55 clostridial), se prefieren las siguientes:

Enterocinasa	(DDDDK↓)
Factor Xa	(IEGR↓/DGR↓)
VGT (virus del grabado del tabaco)	(ENLYFQ↓G)

Trombina	(LVPR↓GS)
PreScission	(LEVLFQ↓GP).
CleanCut	(WELQ↓X)

(X indica cualquier aminoácido excluyendo prolina)

- 5 **[0053]** También se incluye por la expresión sitio de escisión por proteasa una inteína, que es una secuencia de auto-escisión. La reacción de auto-corte y empalme es controlable, por ejemplo, variando la concentración de agente reductor presente. Los sitios de escisión por "activación" que se han mencionado anteriormente también pueden emplearse como sitio de escisión "destruktiva" (analizado más adelante) en caso de que uno deba incorporarse en un polipéptido de la presente invención.
- 10 **[0054]** En una realización preferida, la proteína de fusión de la presente invención puede comprender uno o más marcadores de purificación localizadas en el extremo N y/o extremo C. Aunque puede emplearse cualquier marcador de purificación, se prefieren las siguientes:
- 15 His-tag (por ejemplo, 6 x histidina), preferiblemente como un marcador del extremo C y/o extremo N  
 MBP-tag (proteína de unión a maltosa), preferiblemente como un marcador del extremo N  
 GST-tag (glutación-S-transferasa), preferiblemente como un marcador del extremo N  
 His-MBP-tag, preferiblemente como un marcador del extremo N  
 GST-MBP-tag, preferiblemente como un marcador del extremo N  
 Tiorredoxina-tag, preferiblemente como un marcador del extremo N  
 20 CBD-tag (dominio de unión a quitina), preferiblemente como un marcador del extremo N.
- [0055]** Pueden incluirse una o más moléculas de separador/enlazador de péptido en la proteína de fusión. Por ejemplo, puede emplearse un separador de péptido entre un marcador de purificación y el resto de la molécula de la proteína de fusión.
- 25 **[0056]** Así, un tercer aspecto de la presente invención proporciona una secuencia de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) que codifica un polipéptido como se ha descrito anteriormente.
- [0057]** Dicho ácido nucleico puede incluirse en forma de un vector, tal como un plásmido, que opcionalmente puede incluir uno o más de un origen de replicación, un sitio de integración de ácido nucleico, un promotor, un terminador y un sitio de unión a ribosoma.
- 30 **[0058]** La presente invención también incluye un procedimiento para expresar la secuencia de ácidos nucleicos que se ha descrito anteriormente (es decir, el tercer aspecto de la presente invención) en una célula huésped, en particular en *E. coli*.
- 35 **[0059]** También se desvela en el presente documento un procedimiento para activar un polipéptido de la presente invención, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto el polipéptido con una proteasa que escinde el polipéptido en un sitio de reconocimiento (sitio de escisión) localizado entre el componente de proteasa no citotóxica y el componente de translocación, convirtiendo así el polipéptido en un polipéptido de di-cadena en el que los componentes de proteasa no citotóxica y de translocación se unen por un enlace disulfuro. Preferiblemente, el sitio de reconocimiento no es nativo para una neurotoxina clostridial de origen natural y/o para una proteasa de IgA de origen natural.
- 40 **[0060]** Los polipéptidos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para reducir o prevenir efectos secundarios no deseados asociados a la dispersión en áreas no diana. Según esta realización, el polipéptido comprende un sitio de escisión destructiva. El sitio de escisión destructiva es distinto del sitio de "activación" (es decir, formación de di-cadena), y es escindible por una segunda proteasa y no por la proteasa no citotóxica. Además, cuando se escinde así en el sitio de escisión destructiva por la segunda proteasa, el polipéptido tiene potencia reducida (por ejemplo, capacidad de unión reducida a la célula diana prevista, actividad de translocación reducida y/o actividad de proteasa no citotóxica reducida). Para completitud, cualquiera de los sitios de escisión "destruktivos" de la presente invención puede emplearse por separado como un sitio de "activación" en un polipéptido de la presente invención.
- 45 **[0060]** Los polipéptidos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para reducir o prevenir efectos secundarios no deseados asociados a la dispersión en áreas no diana. Según esta realización, el polipéptido comprende un sitio de escisión destructiva. El sitio de escisión destructiva es distinto del sitio de "activación" (es decir, formación de di-cadena), y es escindible por una segunda proteasa y no por la proteasa no citotóxica. Además, cuando se escinde así en el sitio de escisión destructiva por la segunda proteasa, el polipéptido tiene potencia reducida (por ejemplo, capacidad de unión reducida a la célula diana prevista, actividad de translocación reducida y/o actividad de proteasa no citotóxica reducida). Para completitud, cualquiera de los sitios de escisión "destruktivos" de la presente invención puede emplearse por separado como un sitio de "activación" en un polipéptido de la presente invención.
- 50 **[0061]** Así, de acuerdo con esta realización, la presente invención proporciona un polipéptido que puede inactivarse y/o destruirse de forma controlada en una localización fuera del emplazamiento.
- 55 **[0061]** Así, de acuerdo con esta realización, la presente invención proporciona un polipéptido que puede inactivarse y/o destruirse de forma controlada en una localización fuera del emplazamiento.



**[0062]** En una realización preferida, el sitio de escisión destructiva se reconoce y se escinde por una segunda proteasa (es decir, una proteasa destructiva) seleccionada entre una proteasa en circulación (por ejemplo, una proteasa extracelular, tal como una proteasa del suero o una proteasa de la cascada de coagulación de la sangre),  
 5 una proteasa asociada a tejido (por ejemplo, una metaloproteasa de matriz (MMP), tal como una MMP de músculo), y una proteasa intracelular (preferiblemente una proteasa que se ausenta de la célula diana).

**[0063]** Por lo tanto, durante el uso, si un polipéptido de la presente invención se dispersa lejos de su célula diana prevista y/o es capturado por una célula no diana, el polipéptido se inactivará por la escisión del sitio de escisión  
 10 destructiva (por la segunda proteasa).

**[0064]** En una realización, el sitio de escisión destructiva se reconoce y se escinde por una segunda proteasa que está presente dentro de un tipo de célula fuera del emplazamiento. En esta realización, la célula fuera del emplazamiento y la célula diana son preferiblemente tipos diferentes de células. Como alternativa (o además), el  
 15 sitio de escisión destructiva se reconoce y se escinde por una segunda proteasa que está presente en una localización fuera del emplazamiento (por ejemplo, distal a la célula diana). Por consiguiente, cuando la escisión destructiva se produce extracelularmente, la célula diana y la célula fuera del emplazamiento pueden ser tanto los mismos tipos de células como diferentes. A este respecto, cada una de la célula diana y la célula fuera del emplazamiento puede poseer un receptor al que se une el mismo polipéptido de la invención.  
 20

**[0065]** El sitio de escisión destructiva de la presente invención proporciona la inactivación/destrucción del polipéptido cuando el polipéptido está dentro de o en una localización fuera del emplazamiento. A este respecto, la escisión en el sitio de escisión destructiva minimiza la potencia del polipéptido (cuando se compara con un polipéptido idéntico que carece del mismo sitio de escisión destructiva, o que posee el mismo sitio destructivo, pero  
 25 en una forma sin escindir). A modo de ejemplo, la potencia reducida incluye: unión reducida (a un receptor de célula de mamífero) y/o translocación reducida (a través de la membrana endosómica de una célula de mamífero en la dirección del citosol) y/o escisión de proteína SNARE reducida.

**[0066]** Cuando se selecciona un sitio o sitios de escisión destructiva en el contexto de la presente invención, se  
 30 prefiere que el sitio o los sitios de escisión destructiva no sean sustratos para cualquier proteasa que pueda usarse por separado para la modificación postraduccional del polipéptido de la presente invención como parte de su procedimiento de fabricación. A este respecto, las proteasas no citotóxicas de la presente invención emplean normalmente un evento de activación por proteasa (mediante un sitio de escisión por proteasa por "activación" separado, que es estructuralmente distinto del sitio de escisión destructiva de la presente invención). El fin del sitio  
 35 de escisión por activación es escindir un enlace peptídico entre la proteasa no citotóxica y los componentes de translocación o de unión del polipéptido de la presente invención, proporcionando así un polipéptido de di-cadena "activado" en el que dichos dos componentes se unen mediante un enlace disulfuro.

**[0067]** Por lo tanto, para ayudar a garantizar que el sitio o los sitios de escisión destructiva de los polipéptidos de la  
 40 presente invención no afecten adversamente el sitio de escisión por "activación" y posterior formación de enlaces disulfuro, los primeros se introducen preferiblemente en el polipéptido de la presente invención en una posición de al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, y más preferiblemente al menos 60, al menos 70, al menos 80 residuos de aminoácidos (contiguos) lejos del sitio de escisión por "activación".

**[0068]** El sitio o sitios de escisión destructiva y el sitio de escisión por activación son preferiblemente exógenos (es decir, manipulados/artificiales) con respecto a los componentes nativos del polipéptido. En otras palabras, dichos  
 45 sitios de escisión son preferiblemente no inherentes a los componentes nativos correspondientes del polipéptido. A modo de ejemplo, una proteasa o componente de translocación basado en cadena L o cadena H de BoNT/A (respectivamente) puede manipularse de acuerdo con la presente invención para incluir un sitio de escisión. Sin embargo, dicho sitio de escisión no estaría presente en la cadena L o cadena H nativa de BoNT correspondiente. De  
 50 forma análoga, si el componente de resto que elige diana del polipéptido se manipula para incluir un sitio de escisión por proteasa, dicho sitio de escisión no estaría presente en la secuencia nativa correspondiente del resto que elige diana correspondiente.

**[0069]** En una realización preferida de la presente invención, el sitio o sitios de escisión destructiva y el sitio de  
 55 escisión por "activación" no se escinden por la misma proteasa. En una realización, los dos sitios de escisión se diferencian entre sí en que al menos uno, más preferiblemente al menos dos, particularmente preferiblemente al menos tres, y mucho más preferiblemente al menos cuatro, de los aminoácidos tolerados dentro de las secuencias de reconocimiento respectivas es o son diferentes.

**[0070]** A modo de ejemplo, en el caso de una quimera de polipéptidos que contiene un sitio de "activación" de factor Xa entre la cadena L clostridial y los componentes de H<sub>N</sub>, se prefiere emplear un sitio de escisión destructiva que sea un sitio distinto de un sitio de factor Xa, que puede insertarse en cualquier parte en la cadena L y/o el componente o componentes de H<sub>N</sub> y/o el RD. En este escenario, el polipéptido puede modificarse para acomodar un sitio de "activación" alternativo entre la cadena L y los componentes de H<sub>N</sub> (por ejemplo, un sitio de escisión por enterocinasa), en cuyo caso un sitio de escisión por factor Xa separado puede incorporarse en cualquier parte en el polipéptido como el sitio de escisión destructiva. Como alternativa, el sitio de "activación" por el factor Xa existente entre la cadena L y los componentes H<sub>N</sub> puede retenerse e incorporarse un sitio de escisión alternativo tal como un sitio de escisión por trombina como sitio de escisión destructiva.

**[0071]** Cuando se identifican sitios adecuados dentro de la secuencia primaria de cualquiera de los componentes de la presente invención para la inclusión de un sitio o sitios de escisión, es preferible seleccionar una secuencia primaria que se corresponda estrechamente con el sitio de escisión propuesto que va a insertarse. Haciendo esto se introducen cambios estructurales mínimos en el polipéptido. A modo de ejemplo, los sitios de escisión normalmente comprenden al menos 3 residuos de aminoácidos contiguos. Así, en una realización preferida, se selecciona un sitio de escisión que ya posee (en la posición o posiciones correctas) al menos uno, preferiblemente al menos dos de los residuos de aminoácidos que se requieren con el fin de introducir el nuevo sitio de escisión. A modo de ejemplo, en una realización puede introducirse el sitio de escisión por caspasa 3 (DMQD). A este respecto, se identifica una posición de inserción preferida que ya incluye una secuencia primaria seleccionada entre, por ejemplo, Dxxx, xMxx, xxQx, xxxD, DMxx, DxQx, DxxD, xMQx, xMxD, xxQD, DMQx, xMQD, DxQD y DMxD.

**[0072]** De forma análoga, se prefiere introducir los sitios de escisión en regiones expuestas a la superficie. Dentro de las regiones expuestas a la superficie se prefieren regiones de bucle existentes.

**[0073]** En una realización preferida de la presente invención, el sitio o sitios de escisión destructiva se introducen en una o más de la siguiente posición o posiciones, que se basan en la secuencia de aminoácidos primaria de BoNT/A. Mientras se identifican las posiciones de inserción (por comodidad) por referencia a BoNT/A, las secuencias de aminoácidos primarias de dominios de proteasa alternativos y/o dominios de translocación pueden alinearse fácilmente con dichas posiciones de BoNT/A.

**[0074]** Para el componente de proteasa se prefiere una o más de las siguientes posiciones: 27-31, 56-63, 73-75, 78-81, 99-105, 120-124, 137-144, 161-165, 169-173, 187-194, 202-214, 237-241, 243-250, 300-304, 323-335, 375-382, 391-400 y 413-423. La numeración anterior empieza preferiblemente a partir del extremo N del componente de proteasa de la presente invención.

**[0075]** En una realización preferida, el sitio o sitios de escisión destructiva se localizan en una posición superior a 8 residuos de aminoácidos, preferiblemente superior a 10 residuos de aminoácidos, más preferiblemente superior a 25 residuos de aminoácidos, particularmente preferiblemente superior a 50 residuos de aminoácidos del extremo N del componente de proteasa.

**[0076]** De forma análoga, en una realización preferida, el sitio o sitios de escisión destructiva se localizan en una posición superior a 20 residuos de aminoácidos, preferiblemente superior a 30 residuos de aminoácidos, más preferiblemente superior a 40 residuos de aminoácidos, particularmente preferiblemente superior a 50 residuos de aminoácidos del extremo C del componente de proteasa.

**[0077]** Para el componente de translocación se prefiere una o más de las siguientes posiciones: 474-479, 483-495, 507-543, 557-567, 576-580, 618-631, 643-650, 669-677, 751-767, 823-834, 845-859. La numeración anterior admite preferiblemente una posición de inicio de 449 para el extremo N del componente del dominio de translocación de la presente invención y una posición de terminación de 871 para el extremo C del componente del dominio de translocación.

**[0078]** En una realización preferida, el sitio o sitios de escisión destructiva se localizan en una posición superior a 10 residuos de aminoácidos, preferiblemente superior a 25 residuos de aminoácidos, más preferiblemente superior a 40 residuos de aminoácidos, particularmente preferiblemente superior a 50 residuos de aminoácidos del extremo N del componente de translocación. De forma análoga, en una realización preferida, el sitio o sitios de escisión destructiva se localizan en una posición superior a 10 residuos de aminoácidos, preferiblemente superior a 25 residuos de aminoácidos, más preferiblemente superior a 40 residuos de aminoácidos, particularmente preferiblemente superior a 50 residuos de aminoácidos del extremo C del componente de translocación.

- [0079]** En una realización preferida, el sitio o sitios de escisión destructiva se localizan en una posición superior a 10 residuos de aminoácidos, preferiblemente superior a 25 residuos de aminoácidos, más preferiblemente superior a 40 residuos de aminoácidos, particularmente preferiblemente superior a 50 residuos de aminoácidos del extremo N del componente de RD. De forma análoga, en una realización preferida, el sitio o sitios de escisión destructiva se localizan en una posición superior a 10 residuos de aminoácidos, preferiblemente superior a 25 residuos de aminoácidos, más preferiblemente superior a 40 residuos de aminoácidos, particularmente preferiblemente superior a 50 residuos de aminoácidos del extremo C del componente de RD.
- 10 **[0080]** El polipéptido de la presente invención puede incluir uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más) sitios de escisión destructiva por proteasa. Si se incluye más de un sitio de escisión destructiva, cada sitio de escisión puede ser igual o diferente. A este respecto, el uso de más de un sitio de escisión destructiva proporciona inactivación fuera del emplazamiento mejorada. De forma análoga, el uso de dos o más sitios de escisión destructiva diferentes proporciona flexibilidad de diseño adicional.
- 15 **[0081]** El sitio o sitios de escisión destructiva pueden manipularse en cualquiera del componente o componentes siguientes del polipéptido: el componente de proteasa no citotóxica; el componente de translocación; el resto diana; o el péptido de separador (si está presente). A este respecto, el sitio o sitios de escisión destructiva se seleccionan para garantizar un efecto adverso mínimo sobre la potencia del polipéptido (por ejemplo, teniendo efecto mínimo sobre las regiones diana/de unión y/o dominio de translocación, y/o sobre el dominio de proteasa no citotóxica) al mismo tiempo que se asegura que el polipéptido es inestable lejos de su sitio diana/célula diana.
- 20 **[0082]** Se enumeran sitios de escisión destructiva preferidos (más las segundas proteasas correspondientes) en la Tabla que se muestra inmediatamente a continuación. Los sitios de escisión enumerados son puramente ilustrativos y no pretenden ser limitantes para la presente invención.

Segunda proteasa	Secuencia de reconocimiento de sitios de escisión destructiva	Varianza de la secuencia de reconocimiento tolerada P4-P3-P2-P1-▼-P1'-P2'-P3'						
		P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'
Trombina	LVPR▼GS	A, F, G, I, L, T, V o M	A, F, G, I, L, T, V, W o A	P	R	No D o E	No D o E	--
Trombina	GR▼G			G	R	G		
Factor Xa	IEGR▼	A, F, G, I, L, T, V o M	D o E	G	R	---	---	---
ADAM 17 Proteasa similar a trombina de las vías respiratorias humanas (HAT)	PLAQA▼VRSSS SKGR▼SLIGRV							
ACE (peptidil-dipeptidasa A)		---	---	---	---	No P	No D o E	N/A
Elastasa (leucocito)	MEA▼VTY	M, R	E	A, H	V, T	V, T, H	Y	---
Furina	RXR/KR▼	R	X	R o K	R			
Granzima	IEPD▼	I	E	P	D	-	---	--
Caspasa 1		F, W, Y, L	---	H, A, T	D	No P, E.D.Q.K o R	---	---
Caspasa 2	DVAD▼	D	V	A	D	No P, E.D.Q.K o R	---	---

Caspasa 3	DMQD▼	D	M	Q	D	No P, E.D.Q.K o R	---	---
Caspasa 4	LEVD▼	L	E	V	D	No P, E.D.Q.K o R	---	---
Caspasa 5		L o W	E	H	D	---	---	---
Caspasa 6		V	E	H o I	D	No P, E.D.Q.K o R	---	---
Caspasa 7	DEVD▼	D	E	V	D	No P, E.D.Q.K o R	---	---
Caspasa 8		I o L	E	T	D	No P, E.D.Q.K o R	---	---
Caspasa 9	LEHD▼	L	E	H	D	---	---	---
Caspasa 10	IEHD▼	I	E	H	D	---	---	---

**[0083]** Las metaloproteasas de matriz (MMP) son un grupo preferido de proteasas destructivas en el contexto de la presente invención. Dentro de este grupo, se prefiere ADAM17 (EC 3.4.24.86, también conocida como TACE) y escinde una diversidad de proteínas de la superficie celular ancladas a membrana para "deshacerse de" los dominios extracelulares. Adicionalmente, las MMP preferidas incluyen adamalisin, serralisin y astacinas.

**[0084]** Otro grupo de proteasas destructivas preferidas es una de proteasa de sangre de mamífero, tal como trombina, factor de coagulación VIIa, factor de coagulación IXa, factor de coagulación Xa, factor de coagulación XIa, factor de coagulación XIIa, calicreína, proteína C y serina proteasa asociada a MBP.

**[0085]** En una realización de la presente invención, dicho sitio de escisión destructiva comprende una secuencia de reconocimiento que tiene al menos 3 ó 4, preferiblemente 5 ó 6, más preferiblemente 6 ó 7, y particularmente preferiblemente al menos 8 residuos de aminoácidos contiguos. A este respecto, cuanto más larga (en términos de residuos de aminoácidos contiguos) sea la secuencia de reconocimiento, menor será la probabilidad de que se produzca la escisión no específica del sitio destructivo mediante una segunda proteasa no propuesta.

**[0086]** Se prefiere que el sitio de escisión destructiva de la presente invención se introduzca en el componente de proteasa y/o el resto diana y/o en el componente de translocación y/o en el péptido separador. De estos cuatro componentes, se prefiere el componente de proteasa. Por consiguiente, el polipéptido puede inactivarse rápidamente por destrucción directa de la proteasa no citotóxica y/o componentes de unión y/o de translocación.

### Administración de polipéptidos

**[0087]** Durante el uso, la presente invención emplea una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, junto con al menos un componente seleccionado entre un vehículo, excipiente, adyuvante, propulsor y/o sal farmacéuticamente aceptable.

**[0088]** Los polipéptidos de la presente invención pueden formularse para administración oral, parenteral, infusión continua, inhalación o tópica. Las composiciones adecuadas para inyección pueden estar en forma de soluciones, suspensiones o emulsiones, o polvos secos que se disuelven o se suspenden en un vehículo adecuado antes de uso.

**[0089]** En el caso de un polipéptido que se va a administrar por vía local, el polipéptido puede formularse como una crema (por ejemplo para administración tópica), o para inyección subdérmica.

**[0090]** Los medios de administración local pueden incluir un aerosol u otro pulverizador (por ejemplo, un nebulizador). A este respecto, una formulación de aerosol de un polipéptido permite la administración a los pulmones y/u otras vías nasales y/o bronquiales o respiratorias.

**[0091]** Una vía de administración es a través de inyección laparoscópica y/o localizada. Como alternativa (o además), la administración puede ser sistémica, tal como una administración intravenosa.

**[0092]** En el caso de formulaciones para inyección, es opcional incluir una sustancia farmacéuticamente activa para facilitar la retención en o reducir la eliminación del polipéptido del sitio de administración. Un ejemplo de una sustancia farmacéuticamente activa de este tipo es un vasoconstrictor, tal como adrenalina. Una formulación de este tipo confiere la ventaja de aumentar el tiempo de residencia del polipéptido tras la administración y así aumentar y/o potenciar su efecto.

**[0093]** Los polipéptidos de la invención pueden administrarse a un paciente por inyección intratecal o epidural en la columna vertebral a nivel del segmento de la columna implicado en la inervación de un órgano afectado.

**[0094]** Los intervalos de dosificación para administración de los polipéptidos de la presente invención son aquellos que producen el efecto terapéutico deseado. Se apreciará que el intervalo de dosificación requerido depende de la naturaleza precisa del polipéptido o composición, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la edad del paciente, la naturaleza, grado o gravedad de la afección del paciente, contraindicaciones, si las hay, y el criterio del médico adjunto. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas convencionales para optimización.

**[0095]** Las dosificaciones diarias adecuadas (por kg de peso de paciente) están en el intervalo 0,0001-1 ng/kg, preferiblemente 0,0001-0,5 ng/kg, más preferiblemente 0,002-0,5 ng/kg, y particularmente preferiblemente 0,004-0,5 ng/kg. La dosificación unitaria puede variar de menos de 1 picogramo a 30 ng, pero normalmente estará en la región de 0,01 a 1 ng por dosis, que puede administrarse diariamente o preferiblemente menos frecuentemente, tal como semanalmente o semestralmente.

**[0096]** Una pauta de dosificación particularmente preferida se basa en 2,5 ng de polipéptido como 1 x dosis. A este respecto, las dosificaciones preferidas están en el intervalo 1 x-100 x (es decir, 2,5-250 ng).

**[0097]** Las formas de dosificación fluidas se preparan normalmente utilizando el polipéptido y un vehículo estéril libre de pirógenos. El polipéptido, dependiendo del vehículo y la concentración usados, puede estar tanto disuelto como suspendido en el vehículo. En la preparación de disoluciones, el polipéptido puede disolverse en el vehículo, haciéndose la solución isotónica si fuera necesario mediante la adición de cloruro sódico y esterilizándose por filtración a través de un filtro estéril usando técnicas asépticas antes del envasado en viales o ampollas estériles adecuadas y el cierre hermético. Como alternativa, si la estabilidad en solución es adecuada, la solución en sus recipientes cerrados herméticamente puede esterilizarse en autoclave. Ventajosamente, en el vehículo pueden disolverse aditivos tales como tamponantes, solubilizantes, estabilizantes, conservantes o bactericidas, agentes de suspensión o emulsionantes y/o agentes anestésicos locales.

**[0098]** Pueden prepararse polvos secos, que se disuelven o se suspenden en un vehículo adecuado antes de su uso, envasando ingredientes previamente esterilizados en un recipiente estéril usando una técnica aséptica en un área estéril. Como alternativa, los ingredientes pueden disolverse en recipientes adecuados usando una técnica aséptica en un área estéril. Después, el producto se liofiliza y los recipientes se cierran herméticamente de forma aséptica.

**[0099]** Se preparan suspensiones parenterales, adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea o intradérmica, sustancialmente del mismo modo, excepto que los componentes estériles se suspenden en el vehículo estéril en lugar de disolverse y la esterilización no puede realizarse por filtración. Los componentes pueden aislarse en un estado estéril o, como alternativa, pueden esterilizarse después del aislamiento, por ejemplo, por irradiación gamma.

**[0100]** Ventajosamente, se incluye un agente de suspensión, por ejemplo, polivinilpirrolidona, en la composición o composiciones para facilitar la distribución uniforme de los componentes.

**[0101]** La administración puede aprovechar una diversidad de tecnologías de administración que incluyen encapsulación en micropartículas, sistemas de administración viral o impacto de aerosol a alta presión.

## 55 Sección de definiciones

**[0102]** Resto diana (RD) se refiere a una estructura que interactúa funcionalmente con un Sitio de Unión para producir una asociación física entre el polipéptido de la invención y la superficie de una célula diana (típicamente una célula de mamífero, especialmente una célula humana). El término RD incluye cualquier molécula (es decir, una

- molécula de origen natural, o una variante químicamente/físicamente modificada de la misma) que puede unirse a un Sitio de Unión sobre la célula diana, cuyo Sitio de Unión que es capaz de internalización (por ejemplo, formación de endosoma) - también denominada endocitosis mediada por receptor. El RD puede poseer una función de translocación de membrana endosómica, en cuyo caso los componentes de RD y del Dominio de Translocación separados no necesitan estar presentes en un agente de la presente invención. A lo largo de esta memoria descriptiva se han descrito RD específicos, por ejemplo, por referencia a las SEQ ID NO. La referencia a dichos RD es simplemente a modo de ejemplo, y la presente invención incluye todas las variantes y derivados de los mismos, que retienen la capacidad de unión básica (es decir, elección como diana) de los RD ejemplificados.
- 10 **[0103]** El RD de la presente invención se une (preferiblemente se une específicamente) a la célula diana en cuestión. La expresión "se une específicamente a" significa preferiblemente que un RD dado (por ejemplo con los componentes de proteína de fusión adicionales, tales como el componente de translocación y/o el componente de endopeptidasa) se une a la célula diana con una afinidad de unión ( $K_a$ ) de  $10^8 M^{-1}$  o superior, preferiblemente  $10^9 M^{-1}$  o superior, más preferiblemente  $10^{10} M^{-1}$  o superior, y mucho más preferiblemente  $10^{11} M^{-1}$  o superior.
- 15 **[0104]** La referencia a RD en la presente memoria descriptiva incluye y variantes de los mismos que retienen la capacidad para unirse a la célula diana y/o al receptor de EGF (por ejemplo ErbB) en cuestión. A modo de ejemplo, una variante puede tener al menos el 95% de homología de secuencias de aminoácidos con el RD de referencia SEQ ID NO: 11. Una variante puede incluir uno o más análogos de un aminoácido (por ejemplo, un aminoácido no natural), o un enlace sustituido.
- 20 **[0105]** Es rutina confirmar que un RD se une a la célula diana seleccionada. Por ejemplo, puede emplearse un simple experimento de desplazamiento radiactivo en el que el tejido o las células representativas de una célula diana (por ejemplo una célula secretora de mucus, o una célula inflamatoria) se exponen a RD marcado (por ejemplo, tritiado) en presencia de un exceso de RD sin marcar. En un experimento de este tipo, las proporciones relativas de unión no específica y específica pueden evaluarse, permitiendo así la confirmación de que el RD se une a la célula diana. Opcionalmente, el ensayo puede incluir uno o más antagonistas de unión, y el ensayo puede comprender adicionalmente observar una pérdida de unión de RD. Pueden encontrarse ejemplos de este tipo de experimento en Hulme, E.C. (1990), Receptor-binding studies, a brief outline, págs. 303-311, en Receptor biochemistry, A Practical Approach, Ed. E.C. Hulme, Oxford Universidad Press.
- 25 **[0106]** Los polipéptidos de la presente invención carecen de un dominio  $H_c$  funcional de una neurotoxina clostridial. Por consiguiente, dichos polipéptidos no pueden unirse a membranas sinaptosómicas de rata (mediante un componente  $H_c$  clostridial) en ensayos de unión como se describe en Shone y col. (1985) Eur. J. Biochem. 151, 75-82. En una realización preferida, los polipéptidos carecen preferiblemente de los 50 últimos aminoácidos del extremo C de una holotoxina de neurotoxina clostridial. En otra realización, los polipéptidos carecen preferiblemente de los 100 últimos, preferiblemente los 150 últimos, más preferiblemente los 200 últimos, particularmente preferiblemente los 250 últimos, y mucho más preferiblemente los 300 últimos residuos de aminoácidos del extremo C de una holotoxina de neurotoxina clostridial. Como alternativa, la actividad de unión de  $H_c$  puede invalidarse/reducirse por mutagénesis - a modo de ejemplo, con referencia a BoNT/A por comodidad, la modificación de una o dos mutaciones de residuos de aminoácido (W1266 a L y Y1267 a F) en el sitio de unión a gangliósido hace que la región  $H_c$  pierda su función de unión a receptor. Pueden hacerse mutaciones análogas a componentes de péptidos clostridiales de no serotipo A, por ejemplo, una construcción basada en botulina B con mutaciones (W1262 a L y Y1263 a F) o botulina E (W1224 a L y Y1225 a F). Otras mutaciones al sitio activo consiguen la misma ablación de actividad de unión a receptor de  $H_c$ , por ejemplo, Y1267S en la toxina botulínica tipo A y el residuo altamente conservado correspondiente en las otras neurotoxinas clostridiales. Se describen detalles de estas y otras mutaciones en Rummel y col. (2004) (Molecular Microbiol. 51: 631-634).
- 30 **[0107]** El péptido  $H_c$  de una neurotoxina clostridial nativa comprende aproximadamente 400-440 residuos de aminoácidos y consiste en dos dominios funcionalmente distintos de aproximadamente 25 kDa cada uno, concretamente la región del extremo N (comúnmente denominada el péptido o dominio  $H_{cN}$ ) y la región del extremo C (comúnmente denominada el péptido o dominio  $H_{cC}$ ). Este hecho se confirma por las siguientes publicaciones: Umland TC (1997) Nat. Struct. Biol. 4: 788-792; Herreros J (2000) Biochem. J. 347: 199-204; Halpern J (1993) J. Biol. Chem. 268: 15, págs. 11188-11192; Rummel A (2007) PNAS 104: 359-364; Lacey DB (1998) Nat. Struct. Biol. 5: 898-902; Knapp (1998) Am. Cryst. Assoc. Abstract Papers 25: 90; Swaminathan y Eswaramoorthy (2000) Nat. Struct. Biol. 7: 1751-1759; y Rummel A (2004) Mol. Microbiol. 51(3), 631-643. Además, se ha documentado bien que la región del extremo C ( $H_{cC}$ ), que constituye 160-200 residuos de aminoácidos del extremo C, es responsable de la unión de una neurotoxina clostridial a sus receptores de células naturales, concretamente a terminaciones nerviosas en la unión neuromuscular - este hecho también se confirma por las publicaciones anteriores. Por lo tanto, a
- 50
- 55

referencia a lo largo de toda la memoria descriptiva a una cadena pesada clostridial que carece de un péptido H<sub>C</sub> de la cadena pesada funcional (o dominio) de forma que la cadena pesada sea incapaz de unirse a receptores de la superficie celular con los que una neurotoxina clostridial nativa se une significa que la cadena pesada clostridial simplemente carece de un péptido H<sub>CC</sub> funcional. En otras palabras, la región de péptido H<sub>CC</sub> está tanto parcialmente  
5 como completamente delecionada, o de otro modo modificada (por ejemplo, mediante tratamiento químico o proteolítico convencional) para inactivar su capacidad de unión nativa a terminaciones nerviosas en la unión neuromuscular.

**[0108]** Por lo tanto, en una realización, un péptido H<sub>N</sub> clostridial de la presente invención carece de parte de una  
10 porción de péptido del extremo C (H<sub>CC</sub>) de una neurotoxina clostridial y, por lo tanto, carece de la función de unión de H<sub>C</sub> de neurotoxina clostridial nativa. A modo de ejemplo, en una realización, el péptido H<sub>N</sub> clostridial extendido del extremo C carece de 40 residuos de aminoácidos del extremo C, o 60 residuos de aminoácidos del extremo C, u 80  
15 residuos de aminoácidos del extremo C, o los 100 residuos de aminoácidos del extremo C, o 120 residuos de aminoácidos del extremo C, o 140 residuos de aminoácidos del extremo C, o 150 residuos de aminoácidos del extremo C, o 160 residuos de aminoácidos del extremo C de una cadena pesada de neurotoxina clostridial. En otra  
realización, el péptido H<sub>N</sub> clostridial de la presente invención carece de la toda porción de péptidos del extremo C (H<sub>CC</sub>) de una neurotoxina clostridial y, por lo tanto, carece de la función de unión de H<sub>C</sub> de neurotoxina clostridial  
nativa. A modo de ejemplo, en una realización, el péptido H<sub>N</sub> clostridial carece de 165 residuos de aminoácidos del  
extremo C, o 170 residuos de aminoácidos del extremo C, o 175 residuos de aminoácidos del extremo C, o 180  
20 residuos de aminoácidos del extremo C, o 185 residuos de aminoácidos del extremo C, o 190 residuos de aminoácidos del extremo C, o 195 residuos de aminoácidos del extremo C de una cadena pesada clostridial de neurotoxina. A modo de ejemplo adicional, el péptido H<sub>N</sub> clostridial de la presente invención carece de una secuencia de referencia de H<sub>CC</sub> clostridial seleccionada entre el grupo que consiste en:

25 Neurotoxina botulínica tipo A - residuos de aminoácidos (Y1111-L1296)  
Neurotoxina botulínica tipo B - residuos de aminoácidos (Y1098-E1291)  
Neurotoxina botulínica tipo C - residuos de aminoácidos (Y1112-E1291)  
Neurotoxina botulínica tipo D - residuos de aminoácidos (Y1099-E1276)  
Neurotoxina botulínica tipo E - residuos de aminoácidos (Y1086-K1252)  
30 Neurotoxina botulínica tipo F - residuos de aminoácidos (Y1106-E1274)  
Neurotoxina botulínica tipo G - residuos de aminoácidos (Y1106-E1297)  
Neurotoxina tetánica - residuos de aminoácidos (Y1128-D1315).

**[0109]** Las secuencias de referencia que se han identificado anteriormente deben considerarse una guía, ya que  
35 pueden producirse ligeras variaciones según los subserotipos.

**[0110]** La proteasa de la presente invención incluye todas las proteasas no citotóxicas que pueden escindir una o  
más proteínas SNARE del aparato de fusión exocítico en células eucariotas.

40 **[0111]** La proteasa de la presente invención es preferiblemente una proteasa bacteriana (o fragmento de la misma). Más preferiblemente, la proteasa bacteriana se selecciona entre los géneros *Clostridium* (por ejemplo, una cadena L clostridial). La proteasa de la presente invención demuestra preferiblemente una actividad de serina o metaloproteasa (por ejemplo, actividad de endopeptidasa).

45 **[0112]** La presente invención también incluye proteasas no citotóxicas de variantes (es decir, variantes de moléculas de proteasa de origen natural), mientras que las proteasas de variante todavía demuestran la actividad de proteasa requerida. A modo de ejemplo, una variante puede tener al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, y mucho más preferiblemente al menos el 95 o al menos el 98% de homología de secuencias de aminoácidos con una secuencia de proteasa de referencia. Por lo tanto, el término  
50 variante incluye proteasas no citotóxicas que tienen actividad de endopeptidasa potenciada (o disminuida) - aquí se hace mención particular a las elevadas K<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> de mutantes de BoNT/A Q161A, E54A, y K165L, véase Ahmed, S.A. (2008) Protein J. DOI 10.1007/s10930-007-9118-8. El término fragmento, cuando se usa en relación con una proteasa, normalmente se refiere a un péptido que tiene al menos 150, preferiblemente al menos 200, más preferiblemente al menos 250, y mucho más preferiblemente al menos 300 residuos de aminoácidos de la proteasa  
55 de referencia. Al igual que con el componente de "fragmento" de RD (que se ha analizado anteriormente), los "fragmentos" de proteasa de la presente invención incluyen fragmentos de proteasas de variante en base a una secuencia de referencia.

**[0113]** Se hace mención particular a los dominios de proteasa de neurotoxinas, por ejemplo, los dominios de

proteasa de neurotoxinas bacterianas. Por lo tanto, la presente invención incluye el uso de dominios de neurotoxina que se producen en la naturaleza, así como versiones recombinantemente preparadas de dichas neurotoxinas de origen natural.

5 **[0114]** Las neurotoxinas a modo de ejemplo se producen por clostridios, y la expresión neurotoxina clostridial incluye neurotoxinas producidas por *C. tetani* (TeNT) y por serotipos A-G de *C. botulinum* (BoNT), así como las neurotoxinas similares a BoNT estrechamente relacionadas producidas por *C. baratii* y *C. butyricum*. Las abreviaturas que se han mencionado anteriormente se usan a lo largo de toda la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, la nomenclatura BoNT/A indica la fuente de neurotoxina BoNT (serotipo A). Se aplica una nomenclatura  
10 correspondiente a otros serotipos de BoNT.

**[0115]** BoNT son las toxinas más potentes conocidas, con valores de la dosis letal media (DL50) para ratones que oscilan de 0,5 a 5 ng/kg dependiendo del serotipo. Las BoNT se adsorben en el tracto gastrointestinal, y, después de entrar en la circulación general, se unen a la membrana presináptica de terminaciones nerviosas colinérgicas y  
15 previenen la liberación de su neurotransmisor acetilcolina.

**[0116]** Las BoNT comparten una estructura común, siendo proteínas de di-cadena de ~150 kDa que consisten en una cadena pesada (cadena H) de ~100 kDa covalentemente unida por un único enlace disulfuro a una cadena ligera (cadena L) de ~50 kDa. La cadena H consiste en dos dominios, cada uno de ~50 kDa. El dominio del extremo  
20 C (H<sub>C</sub>) se requiere para la unión neuronal de alta afinidad, mientras que el dominio del extremo N (H<sub>N</sub>) se propone que participa en la translocación de la membrana. La cadena L es una metaloproteasa dependiente de cinc responsable de la escisión de la proteína SNARE del sustrato.

**[0117]** La expresión fragmento de cadena L se refiere a un componente de la cadena L de una neurotoxina,  
25 fragmento que demuestra una actividad de metaloproteasa y puede escindir proteolíticamente una proteína SNARE no neuronal.

**[0118]** Los ejemplos de secuencias de proteasa (referencia) adecuadas incluyen:

30 Neurotoxina botulínica tipo A - residuos de aminoácidos (1-448)  
Neurotoxina botulínica tipo B - residuos de aminoácidos (1-440)  
Neurotoxina botulínica tipo C - residuos de aminoácidos (1-441)  
Neurotoxina botulínica tipo D - residuos de aminoácidos (1-445)  
Neurotoxina botulínica tipo E - residuos de aminoácidos (1-422)  
35 Neurotoxina botulínica tipo F - residuos de aminoácidos (1-439)  
Neurotoxina botulínica tipo G - residuos de aminoácidos (1-441)  
Neurotoxina tetánica - residuos de aminoácidos (1-457)

**[0119]** La secuencia de referencia que se ha identificado anteriormente debe considerarse una guía, ya que  
40 pueden producirse ligeras variaciones según subserotipos. A modo de ejemplo, el documento US 2007/0166332 cita secuencias clostridiales ligeramente diferentes:

45 Neurotoxina botulínica tipo A - residuos de aminoácidos (M1-K448)  
Neurotoxina botulínica tipo B - residuos de aminoácidos (M1-K441)  
Neurotoxina botulínica tipo C - residuos de aminoácidos (M1-K449)  
Neurotoxina botulínica tipo D - residuos de aminoácidos (M1-R445)  
Neurotoxina botulínica tipo E - residuos de aminoácidos (M1-R422)  
Neurotoxina botulínica tipo F - residuos de aminoácidos (M1-K439)  
Neurotoxina botulínica tipo G - residuos de aminoácidos (M1-K446)  
50 Neurotoxina tetánica - residuos de aminoácidos (M1-A457)

**[0120]** Una diversidad de fragmentos de toxinas clostridiales que comprenden la cadena ligera pueden ser útiles en aspectos de la presente invención con la condición de que estos fragmentos de la cadena ligera puedan dirigirse específicamente a los componentes centrales del aparato de liberación de neurotransmisores y así participar en la  
55 ejecución del mecanismo celular global por el cual una toxina clostridial escinde proteolíticamente un sustrato. Las cadenas ligeras de toxinas clostridiales tienen aproximadamente 420-460 aminoácidos de longitud y comprenden un dominio enzimático. La investigación ha mostrado que la longitud entera de una cadena ligera de toxina clostridial no es necesaria para la actividad enzimática del dominio enzimático. Como ejemplo no limitante, no se requieren los ocho primeros aminoácidos de la cadena ligera de BoNT/A para una actividad enzimática. Como otro ejemplo no



limitante, no se requieren los ocho primeros aminoácidos de la cadena ligera de TeNT para una actividad enzimática. Asimismo, el extremo carboxilo de la cadena ligera no es necesario para la actividad. Como ejemplo no limitante, los últimos 32 aminoácidos de la cadena ligera de BoNT/A (residuos 417-448) no se requieren para actividad enzimática. Como otro ejemplo no limitante, los últimos 31 aminoácidos de la cadena ligera de TeNT (residuos 427-457) no se requieren para actividad enzimática. Por lo tanto, los aspectos de esta realización pueden incluir cadenas ligeras de toxina clostridial que comprenden un dominio enzimático que tiene una longitud de, por ejemplo, al menos 350 aminoácidos, al menos 375 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos, al menos 425 aminoácidos y al menos 450 aminoácidos. Otros aspectos de esta realización pueden incluir cadenas ligeras de toxina clostridial que comprenden un dominio enzimático que tiene una longitud de, por ejemplo, como máximo 350 aminoácidos, como máximo 375 aminoácidos, como máximo 400 aminoácidos, como máximo 425 aminoácidos y como máximo 450 aminoácidos.

15 **[0121]** El componente de proteasa no citotóxica de la presente invención comprende preferiblemente una cadena L de serotipo de BoNT/A, C o D (o un fragmento o variante de la misma).

20 **[0122]** Los polipéptidos de la presente invención, especialmente el componente de proteasa de los mismos, puede PEGilarse - esto puede ayudar a aumentar la estabilidad, por ejemplo, la duración de la acción del componente de proteasa. La PEGilación es particularmente preferida cuando la proteasa comprende una proteasa BoNT/E. La PEGilación incluye preferiblemente la adición de PEG al extremo N del componente de proteasa. A modo de ejemplo, el extremo N de una proteasa puede extenderse con uno o más residuos de aminoácidos (por ejemplo, cisteína), que pueden ser iguales o diferentes. Uno o más de dichos residuos de aminoácidos pueden tener su propia molécula de PEG unida (por ejemplo, covalentemente unida) al mismo. Se describe un ejemplo de esta tecnología en el documento WO2007/104567.

25 **[0123]** Los polipéptidos de la presente invención pueden incluir mutaciones y/o deleciones en uno o más "sitios de modificación secundarios" - estos sitios se dirigen a y actúan según las enzimas (tales como enzimas intracelulares), lo que altera la persistencia biológica de los polipéptidos de la invención. Dichas mutaciones/deleciones pueden comprender la mutación o deleción de parte o cada uno de dicho uno o más sitios de modificación secundarios. Un aumento de este tipo de la persistencia biológica se desea particularmente cuando se desea la longevidad de la acción del componente de proteasa no citotóxica de la presente invención. Como alternativa, los polipéptidos de la invención pueden incluir la adición de uno o más sitios de modificación secundarios.

35 **[0124]** La mutación o deleción de parte o cada uno de un sitio de modificación secundario encontrado en un polipéptido de la presente invención, o la adición de un sitio de modificación secundario a un polipéptido de la presente invención, puede conducir a una persistencia biológica mejorada del polipéptido. En términos generales, la persistencia biológica del polipéptido puede ser aproximadamente del 20% a aproximadamente el 300% superior que en ausencia de cualquier modificación estructural para un sitio de modificación secundario. Por lo tanto, la inhibición de la secreción de células diana aumenta en aproximadamente del 20% a aproximadamente el 300%.

40 **[0125]** La persistencia biológica mejorada puede tomar la forma de una semivida biológica aumentada del polipéptido. La semivida biológica del polipéptido aumenta preferiblemente en aproximadamente el 10%; más preferiblemente, la semivida biológica del polipéptido aumenta en aproximadamente el 100%.

45 **[0126]** A modo de ejemplo, la neurotoxina botulínica A y la neurotoxina botulínica E tienen los siguientes sitios de modificación secundarios potenciales, como se muestra en las Tablas A y B, respectivamente. Estos sitios pueden seleccionarse como diana para la mutación o deleción de todo o parte del sitio.

**Tabla A**

50 **[0127]** N-glicosilación: 173- NLTR; 382- NYTI; 411- NFTK; 417- NFTG

**[0128]** Sitios de fosforilación de caseína cinasa II (CK-2): 51-TNPE; 70-SYYD; 79-TDNE; 120-STID; 253-SGLE; 258-SFEE; 275-SLQE; 384-TIYD

55 **[0129]** Sitios de miristilación del extremo N: 15- GVDIAY; 141- GSYRSE; 254- GLEVSF

**[0130]** Sitios de fosforilación de la proteína cinasa C (PKC): 142-SYR; 327-SGK; 435-TSK

**[0131]** Sitios de fosforilación de tirosina: 92-KLFEIY; 334-KLKFDKLY

[0132] N-glicosilación: 97-NLSG; 138-NGSG; 161-NSSN; 164-NISL; 365-NDSI; 370-NISE

**Tabla B**

- 5
- [0133] Sitios de fosforilación de caseína cinasa II (CK-2): 51-TPQD; 67-SYYD; 76-SDEE; 130-SAVE; 198-SMNE; 247-TNIE; 333-SFTE; 335-TEFD
- [0134] Sitios de miristilación del extremo N: 220-GLYGAK; 257-GTDLNI; 386-GQNANL
- 10
- [0135] Sitios de fosforilación de la proteína cinasa C (PKC): 60-SLK; 166-SLR; 191-SFR; 228-TTK; 234-TQK; 400-TGR; 417-SVK
- [0136] Sitios de fosforilación de la tirosina cinasa: 62-KNGDSSY; 300-KDVFEAKY
- 15
- [0137] Un ejemplo adicional es la adición de un sitio de fosforilación de caseína cinasa II, tal como TDNE a un polipéptido de la presente invención.
- [0138] Se describen detalles adicionales en el documento WO 2002/40506.
- 20
- [0139] Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender uno o más sitios de fosforilación de tirosina además de cualquier sitio de fosforilación de tirosina existente de forma natural ya presente. El uno o más sitios de fosforilación de tirosina adicionales pueden estar presentes en el componente de proteasa no citotóxica del polipéptido, en el dominio de translocación del polipéptido, o en el dominio diana del polipéptido. Dichos sitios
- 25 pueden añadirse al polipéptido como una adición a la secuencia polipeptídica, o pueden sustituirse en la secuencia polipeptídica. A modo de ejemplo, el sitio de fosforilación de tirosina puede sustituir aproximadamente 1-8, o aproximadamente 1-4, aminoácidos consecutivos del componente de proteasa no citotóxica.
- [0140] La presencia adicional de dichos sitios puede aumentar la persistencia biológica de los polipéptidos. A este respecto, un aumento de la persistencia biológica puede dar como resultado un aumento de la duración de la acción del polipéptido, o un aumento de la semivida del polipéptido, o ambos.
- 30
- [0141] Cualquier sitio de fosforilación por tirosina es adecuado para su uso en los polipéptidos de la presente invención. A modo de ejemplo, los sitios de fosforilación por tirosina adecuados incluyen KLFERY y KLKFDKLY.
- 35
- [0142] Se proporcionan detalles adicionales en el documento US 7223577.
- [0143] Los polipéptidos de la presente invención también pueden tener una mejor persistencia biológica por la presencia en el polipéptido de motivos basados en leucina. Los motivos basados en leucina pueden añadirse
- 40 además a la secuencia polipeptídica o incluirse como una sustitución.
- [0144] Un motivo basado en leucina puede comprender siete aminoácidos contiguos. Estos pueden describirse adicionalmente como que consisten en un grupo de cinco aminoácidos (un quintuplete) y un grupo inmediatamente adyacente a dos aminoácidos (un duplete). El duplete de aminoácidos puede localizarse en el extremo N-terminal o
- 45 C-terminal del motivo basado en leucina.
- [0145] El quintuplete de aminoácidos puede incluir al menos un aminoácido ácido seleccionado entre el grupo que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico.
- 50
- [0146] El duplete de aminoácidos incluye al menos un ácido hidrófobo; los ejemplos de dichos aminoácidos hidrófobos incluyen leucina, isoleucina, metionina, alanina, fenilalanina, triptófano, valina y tirosina. El duplete de aminoácidos es preferiblemente una leucina-leucina, una leucina-isoleucina, una isoleucina-leucina, una isoleucina-isoleucina o una leucina-metionina. El duplete de aminoácidos es incluso más preferiblemente una leucina-leucina.
- 55
- [0147] El quintuplete de aminoácidos puede comprender al menos un aminoácido que contiene un grupo hidroxilo; los ejemplos de dichos aminoácidos incluyen serina, treonina y tirosina. El aminoácido que contiene hidroxilo está preferiblemente fosforilado. Incluso más preferiblemente, el aminoácido que contiene hidroxilo es una serina que puede estar fosforilada para permitir la unión de proteínas de adaptámero.

**[0148]** Los motivos basados en leucina que se han descrito anteriormente también pueden comprender aminoácidos modificados. A modo de ejemplo, un motivo basado en leucina puede incluir una leucina halogenada, preferiblemente una leucina fluorada.

5 **[0149]** Los ejemplos de motivos basados en leucina adecuados incluyen (donde x puede ser cualquier aminoácido) xDxxxLL, xExxxLL, xDxxxLI, xDxxxLM, xExxxLI, xExxxIL, xExxxLM. Un ejemplo adicional de un motivo basado en leucina adecuado es fenilalanina-glutamato-fenilalanina-tirosina-lisina-leucina-leucina.

10 **[0150]** Se encuentran ejemplos adicionales de motivos basados en leucina (obtenidos a partir de diversas especies) que son adecuados para su uso en los polipéptidos de la presente invención en la tabla que se muestra a continuación.

Especie	Secuencia
Botulina tipo A	FEFYKLL
VMAT1 de rata	EEKRAIL
VMAT2 de rata	EEKMAIL
VACHT de rata	SERDVLL
δ de rata	VDTQVLL
δ de ratón	AEVQALL
γ/δ de rana	SDKQNLL
γ/δ de pollo	SDRQNLI
δ de oveja	ADTQVLM
CD3γ humano	SDKQTLL
CD4 humano	SQIKRLL
δ humano	ADTQALL
<i>S. cerevisiae</i> Vam3p	NEQSPLL

15 **[0151]** VMAT: Transportador vesicular de monoaminas (*Vesicular Monoamine Transporter*). VACHT: Transportador vesicular de acetilcolina (*Vesicular Acetylcholine Transporter*). *S. cerevisiae* Vam3p: un homólogo de levadura de sinaptobrevina. Los residuos de serina subrayados son sitios potenciales de fosforilación.

20 **[0152]** Además del uso de los motivos basados en leucina como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de la presente invención también pueden comprender motivos basados en tirosina. La presencia de un motivo basado en tirosina puede actuar para aumentar la persistencia biológica del polipéptido. Los motivos basados en tirosina adecuados para su uso en la presente invención comprenden la secuencia Y-X-X-Hy, donde Y es tirosina, X es cualquier aminoácido, y Hy es un aminoácido hidrófobo. Un ejemplo de un motivo basado en tirosina de este tipo descrito en el documento US 7223577 es YKLL.

25 **[0153]** Se proporcionan detalles adicionales en el documento WO 2005068494.

30 **[0154]** Un dominio de translocación es una molécula que permite la translocación de una proteasa en una célula diana de forma que se produzca una expresión funcional de la actividad de proteasa dentro del citosol de la célula diana. Si cualquier molécula (por ejemplo, una proteína o péptido) posee o no la función de translocación requerida de la presente invención puede confirmarse por uno cualquiera de varios ensayos convencionales.

35 **[0155]** Por ejemplo, Shone C. (1987) describe un ensayo *in vitro* que emplea liposomas, que se exponen a una molécula de prueba. La presencia de la función de translocación necesaria se confirma por la liberación de los liposomas de K<sup>+</sup> y/o NAD marcada, que puede monitorizarse fácilmente [véase Shone C. (1987) Eur. J. Biochem; vol. 167(1): págs. 175-180].

40 **[0156]** Se proporciona un ejemplo adicional por Blaustein R. (1987), que describe un simple ensayo *in vitro* empleando membranas bicapa de fosfolípidos planos. Las membranas se exponen a una molécula de prueba y la función de translocación requerida se confirma por un aumento en la conductancia través de dichas membranas [véase Blaustein (1987) FEBS Letts; vol. 226, N° 1: págs. 115-120].

**[0157]** Metodología adicional para permitir la evaluación de la fusión de membranas y, por lo tanto, la identificación de dominios de translocación adecuados para su uso en la presente invención se proporcionan por *Methods in Enzymology*, vol. 220 y 221, *Membrane Fusion Techniques*, Partes A y B, Academic Press 1993.

45

**[0158]** La presente invención también incluye dominios de translocación de variantes, en tanto que los dominios de variantes todavía demuestren la actividad de translocación requerida. A modo de ejemplo, una variante puede tener al menos el 70%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90%, y mucho más preferiblemente al menos el 95% o al menos el 98% de homología de secuencias de aminoácidos con un dominio de translocación de referencia. El término fragmento, cuando se usa en relación con un dominio de translocación, se refiere a un péptido que tiene al menos 20, preferiblemente al menos 40, más preferiblemente al menos 80, y mucho más preferiblemente al menos 100 residuos de aminoácidos del dominio de translocación de referencia. En el caso de un dominio de translocación clostridial, el fragmento tiene preferiblemente al menos 100, preferiblemente al menos 150, más preferiblemente al menos 200, y mucho más preferiblemente al menos 250 residuos de aminoácidos del dominio de translocación de referencia (por ejemplo, dominio H<sub>N</sub>). Al igual que con el componente de "fragmento" de RD (que se ha analizado anteriormente), los "fragmentos" de translocación de la presente invención incluyen fragmentos de dominios de translocación de variantes basados en las secuencias de referencia.

**[0159]** El dominio de translocación es preferiblemente capaz de formar poros permeables a iones en membranas lipídicas en condiciones de bajo pH. Preferiblemente se ha descubierto el uso de únicamente aquellas porciones de la molécula de proteína que puedan formar poros dentro de la membrana endosómica.

**[0160]** El dominio de translocación puede obtenerse de una fuente de proteínas microbianas, en particular de una fuente de proteínas bacterianas o virales. Por tanto, en una realización, el dominio de translocación es un dominio de translocación de una enzima, tal como una toxina bacteriana o una proteína viral.

**[0161]** Está bien documentado que ciertos dominios de moléculas de toxina bacteriana pueden formar dichos poros. También se sabe que ciertos dominios de translocación de proteínas de fusión de membranas viralmente expresadas pueden formar dichos poros. Dichos dominios pueden emplearse en la presente invención.

**[0162]** El dominio de translocación puede ser de un origen clostridial, tal como el dominio H<sub>N</sub> (o un componente funcional del mismo). H<sub>N</sub> se refiere a una parte o fragmento de la cadena H de una neurotoxina clostridial aproximadamente equivalente a la mitad del extremo amino de la cadena H, o el dominio correspondiente a ese fragmento en la cadena H intacta. La cadena H carece de la función de unión natural del componente H<sub>C</sub> de la cadena H. A este respecto, la función H<sub>C</sub> puede eliminarse por delección de la secuencia aminoacídica de H<sub>C</sub> (tanto al nivel de síntesis de ADN como al nivel de post-síntesis por tratamiento con nucleasa o proteasa). Como alternativa, la función de H<sub>C</sub> puede inactivarse por tratamiento químico o biológico. Por lo tanto, la cadena H es incapaz de unirse al Sitio de Unión sobre una célula diana con la que se une la neurotoxina clostridial nativa (es decir, holotoxina).

**[0163]** Los ejemplos de dominios de translocación (referencia) adecuados incluyen:

- Neurotoxina botulínica tipo A - residuos de aminoácidos (449-871)
- Neurotoxina botulínica tipo B - residuos de aminoácidos (441-858)
- Neurotoxina botulínica tipo C - residuos de aminoácidos (442-866)
- Neurotoxina botulínica tipo D - residuos de aminoácidos (446-862)
- Neurotoxina botulínica tipo E - residuos de aminoácidos (423-845)
- Neurotoxina botulínica tipo F - residuos de aminoácidos (440-864)
- Neurotoxina botulínica tipo G - residuos de aminoácidos (442-863)
- Neurotoxina tetánica - residuos de aminoácidos (458-879)

**[0164]** La secuencia de referencia que se ha identificado anteriormente debe considerarse una guía, ya que pueden producirse ligeras variaciones según subserotipos. A modo de ejemplo, el documento US 2007/0166332 cita secuencias clostridiales ligeramente diferentes:

- Neurotoxina botulínica tipo A - residuos de aminoácidos (A449-K871)
- Neurotoxina botulínica tipo B - residuos de aminoácidos (A442-S858)
- Neurotoxina botulínica tipo C - residuos de aminoácidos (T450-N866)
- Neurotoxina botulínica tipo D - residuos de aminoácidos (D446-N862)
- Neurotoxina botulínica tipo E - residuos de aminoácidos (K423-K845)
- Neurotoxina botulínica tipo F - residuos de aminoácidos (A440-K864)
- Neurotoxina botulínica tipo G - residuos de aminoácidos (S447-S863)
- Neurotoxina tetánica - residuos de aminoácidos (S458-V879)

5 [0165] En el contexto de la presente invención, una diversidad de regiones H<sub>N</sub> de toxina clostridial que comprenden un dominio de translocación pueden ser útiles en aspectos de la presente invención con la condición de que estos fragmentos activos puedan facilitar la liberación de una proteasa no citotóxica (por ejemplo, una cadena L clostridial) de vesículas intracelulares en el citoplasma de la célula diana y así participar en la ejecución del mecanismo celular global por el cual una toxina clostridial escinde proteolíticamente un sustrato. Las regiones H<sub>N</sub> de las cadenas pesadas de toxinas clostridiales tienen aproximadamente 410-430 aminoácidos de longitud y comprenden un dominio de translocación. La investigación ha mostrado que la longitud entera de una región H<sub>N</sub> de una cadena pesada de la toxina clostridial no es necesaria para la actividad de translocación del dominio de translocación. Así, aspectos de esta realización pueden incluir regiones H<sub>N</sub> de toxina clostridial que comprenden un

10 dominio de translocación que tiene una longitud de, por ejemplo, al menos 350 aminoácidos, al menos 375 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos y al menos 425 aminoácidos. Otros aspectos de esta realización pueden incluir regiones H<sub>N</sub> de toxina clostridial que comprenden dominio de translocación que tiene una longitud de, por ejemplo, como máximo 350 aminoácidos, como máximo 375 aminoácidos, como máximo 400 aminoácidos y como máximo 425 aminoácidos.

15

[0166] Para más detalles sobre la base genética de la producción de toxinas en *Clostridium botulinum* y *C. tetani*, los presentes inventores se refieren a Henderson y col. (1997) en *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*, Academic Press.

20 [0167] El término H<sub>N</sub> incluye porciones de H<sub>N</sub> de neurotoxina de origen natural, y porciones de H<sub>N</sub> modificadas que tienen secuencias de aminoácidos que no se producen en la naturaleza y/o residuos de aminoácidos sintéticos, en tanto que las porciones de H<sub>N</sub> modificadas todavía demuestren la función de translocación que se ha mencionado anteriormente.

25 [0168] Como alternativa, el dominio de translocación puede ser de un origen no clostridial. Los ejemplos de orígenes de dominios de translocación no clostridiales (referencia) incluyen, pero sin limitación, el dominio de translocación de toxina diftérica [O'Keefe y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89, 6202-6206; Silverman y col., J. Biol. Chem. (1993) 269, 22524-22532; y London, E. (1992) Biochem. Biophys. Acta., 1112, págs. 25-51], el dominio de translocación de exotoxina de *Pseudomonas* tipo A [Prior y col. Biochemistry (1992) 31, 3555-3559], los dominios

30 de translocación de toxina del carbunco [Blanke y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1996) 93, 8437-8442], una diversidad de péptidos fusogénicos o hidrófobos de función de translocación [Plank y col. J. Biol. Chem. (1994) 269, 12918-12924; y Wagner y col. (1992) PNAS, 89, págs. 7934-7938] y péptidos anfífilicos [Murata y col. (1992) Biochem., 31, págs. 1986-1992]. El dominio de translocación puede reflejar el dominio de translocación presente en una proteína de origen natural, o puede incluir variaciones de aminoácidos en tanto que las variaciones no destruyan

35 la capacidad de translocación del dominio de translocación.

[0169] Los ejemplos particulares de dominios de translocación virales (referencia) adecuados para su uso en la presente invención incluyen ciertos dominios de translocación de proteínas de fusión de membranas viralmente expresadas. Por ejemplo, Wagner y col. (1992) y Murata y col. (1992) describen la función de translocación (es decir,

40 fusión de membranas y vesiculación) de varios péptidos fusogénicos y anfífilicos derivados de la región del extremo N de la hemaglutinina del virus de la gripe. Otras proteínas de fusión de membranas viralmente expresadas conocidas por tener la actividad de translocación deseada son un dominio de translocación de un péptido fusogénico del virus del bosque de Semliki (VBS), un dominio de translocación de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VEV), un dominio de translocación de la proteína F del virus SER y un dominio de translocación de la

45 glicoproteína de la envuelta del virus espumoso. Las proteínas Aspíke viralmente codificadas tienen aplicación particular en el contexto de la presente invención, por ejemplo, la proteína E1 de VBS y la proteína G de la proteína G de VEV.

[0170] El uso de los dominios de translocación (referencia) enumerados en la Tabla (a continuación) incluye el uso

50 de variantes de secuencia de los mismos. Una variante puede comprender una o más sustituciones de ácidos nucleicos conservativas y/o deleciones o inserciones de ácidos nucleicos, con la condición de que la variante posea la función de translocación requerida. Una variante también puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos y/o deleciones o inserciones de aminoácidos, en tanto que la variante posea la función de translocación requerida.

55

Fuente del dominio de translocación	Residuos aminoacídicos	Referencias
Toxina diftérica	194-380	Silverman y col., 1994, J. Biol. Chem. 269, 22524-22532 London E., 1992, Biochem. Biophys. Acta., 1113, 25-51
Dominio II de exotoxina de <i>Pseudomonas</i>	405-613	Prior y col., 1992, Biochemistry 31, 3555-3559 Kihara & Pastan, 1994, Bioconj Chem. 5, 532-538
Hemaglutinina del virus de la gripe	GLFGAIAGFIENGWE GMIDGWYG, y variantes de los mismos	Plank y col., 1994, J. Biol. Chem. 269, 12918-12924 Wagner y col., 1992, PNAS, 89, 7934-7938 Murata y col., 1992, Biochemistry 31, 1986-1992
Proteína fusogénica del virus del bosque de Semliki	<b>Dominio de translocación</b>	Kielian y col., 1996, J Cell Biol. 134 (4), 863-872
Glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular	118-139	Yao y col., 2003, Virology 310(2), 319-332
Proteína F del virus SER	Dominio de translocación	Seth y col., 2003, J Virol 77(11) 6520-6527
Glicoproteína de la envuelta del virus espumoso	Dominio de translocación	Picard-Maureau y col., 2003, J Virol. 77(8), 4722-4730

**[0171]** Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender además un dominio que facilita la translocación. Dicho dominio facilita la administración de la proteasa no citotóxica en el citosol de la célula diana y se describe, por ejemplo, en los documentos WO 08/008803 y WO 08/008805.

**[0172]** A modo de ejemplo, los dominios que facilitan la translocación adecuados incluyen un dominio de péptido fusogénico de virus envuelto, por ejemplo, los dominios de péptidos fusogénicos adecuados incluyen un dominio de péptido fusogénico del virus de la gripe (por ejemplo, dominio de péptido fusogénico del virus de la gripe A de 23 aminoácidos), dominio de péptido fusogénico de alfavirus (por ejemplo, dominio de péptido fusogénico del virus del bosque de Semliki de 26 aminoácidos), dominio de péptido fusogénico de vesiculovirus (por ejemplo, dominio de péptido fusogénico del virus de la estomatitis vesicular de 21 aminoácidos), dominio de péptido fusogénico de respirovirus (por ejemplo, dominio de péptido fusogénico del virus de Sendai de 25 aminoácidos), dominio de péptido fusogénico de morbillivirus (por ejemplo, dominio de péptido fusogénico del virus del moquillo canino de 25 aminoácidos), dominio de péptido fusogénico de avulavirus (por ejemplo, dominio de péptido fusogénico del virus de la enfermedad de Newcastle de 25 aminoácidos), dominio de péptido fusogénico de henipavirus (por ejemplo, dominio de péptido fusogénico del virus de Hendra de 25 aminoácidos), dominio de péptido fusogénico de metapneumovirus (por ejemplo, dominio de péptido fusogénico del metapneumovirus humano de 25 aminoácidos) o dominio de péptido fusogénico de espumavirus tal como dominio de péptido fusogénico del virus espumoso del simio; o fragmentos o variantes de los mismos.

**[0173]** A modo de otro ejemplo, un dominio que facilita la translocación puede comprender un dominio H<sub>CN</sub> de la toxina clostridial o un fragmento o variante del mismo. En más detalle, un dominio que facilita la translocación de H<sub>CN</sub> de toxina clostridial puede tener una longitud de al menos 200 aminoácidos, al menos 225 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 275 aminoácidos. A este respecto, un dominio que facilita la translocación de H<sub>CN</sub> de toxina clostridial tiene preferiblemente una longitud de como máximo 200 aminoácidos, como máximo 225 aminoácidos, como máximo 250 aminoácidos, o como máximo 275 aminoácidos. Los ejemplos específicos (referencia) incluyen:

- 30 Neurotoxina botulínica tipo A - residuos de aminoácidos (872-1110)
- Neurotoxina botulínica tipo B - residuos de aminoácidos (859-1097)
- Neurotoxina botulínica tipo C - residuos de aminoácidos (867-1111)
- Neurotoxina botulínica tipo D - residuos de aminoácidos (863-1098)
- Neurotoxina botulínica tipo E - residuos de aminoácidos (846-1085)
- 35 Neurotoxina botulínica tipo F - residuos de aminoácidos (865-1105)

Neurotoxina botulínica tipo G - residuos de aminoácidos (864-1105)  
 Neurotoxina tetánica - residuos de aminoácidos (880-1127)

**[0174]** Las posiciones de secuencia anteriores pueden variar un poco según el serotipo/subtipo, y los ejemplos adicionales de dominios H<sub>CN</sub> de toxina clostridial (referencia) adecuados incluyen:

Neurotoxina botulínica tipo A - residuos de aminoácidos (874-1110)  
 Neurotoxina botulínica tipo B - residuos de aminoácidos (861-1097)  
 Neurotoxina botulínica tipo C - residuos de aminoácidos (869-1111)  
 Neurotoxina botulínica tipo D - residuos de aminoácidos (865-1098)  
 Neurotoxina botulínica tipo E - residuos de aminoácidos (848-1085)  
 Neurotoxina botulínica tipo F - residuos de aminoácidos (867-1105)  
 Neurotoxina botulínica tipo G - residuos de aminoácidos (866-1105)  
 Neurotoxina tetánica - residuos de aminoácidos (882-1127)

**[0175]** Cualquiera de los dominios falicitadores que se han descrito anteriormente puede combinarse con cualquiera de los péptidos de dominios de translocación que se han descrito previamente que son adecuados para su uso en la presente invención. Por lo tanto, a modo de ejemplo, un dominio facilitador no clostridial puede combinarse con un péptido de dominio de translocación no clostridial o con un péptido de dominio de translocación clostridial. Como alternativa, un dominio que facilita la translocación H<sub>CN</sub> de la toxina clostridial puede combinarse con un péptido de dominio de translocación no clostridial. Como alternativa, un dominio que facilita la translocación H<sub>CN</sub> de la toxina clostridial puede combinarse con un péptido de dominio de translocación clostridial, ejemplos de los cuales incluyen:

Neurotoxina botulínica tipo A - residuos de aminoácidos (449-1110)  
 Neurotoxina botulínica tipo B - residuos de aminoácidos (442-1097)  
 Neurotoxina botulínica tipo C - residuos de aminoácidos (450-1111)  
 Neurotoxina botulínica tipo D - residuos de aminoácidos (446-1098)  
 Neurotoxina botulínica tipo E - residuos de aminoácidos (423-1085)  
 Neurotoxina botulínica tipo F - residuos de aminoácidos (440-1105)  
 Neurotoxina botulínica tipo G - residuos de aminoácidos (447-1105)  
 Neurotoxina tetánica - residuos de aminoácidos (458-1127)

Homología de secuencias:

**[0176]** Puede usarse cualquiera de una diversidad de procedimientos de alineamiento de secuencias para determinar la identidad en porcentaje incluyendo, sin limitación, procedimientos globales, procedimientos locales y procedimientos híbridos tales como, por ejemplo, procedimientos de aproximación de segmentos. Los protocolos para determinar la identidad en porcentaje son procedimientos rutinarios dentro del alcance de un experto en la técnica. Los procedimientos globales alinean secuencias desde el principio hasta el fin de la molécula y determinan el mejor alineamiento añadiendo puntuaciones ascendentes de pares de residuos individuales e imponiendo penalizaciones por huecos. Los procedimientos no limitantes incluyen, por ejemplo, CLUSTAL W, véase, por ejemplo, Julie D. Thompson y col., CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice, 22(22) Nucleic Acids Research 4673-4680 (1994); y refinamiento iterativo, véase, por ejemplo, Osamu Gotoh, Significant Improvement in Accuracy of Multiple Protein. Sequence Alignments by Iterative Refinement as Assessed by Reference to Structural Alignments, 264(4) J. Mol. Biol. 823-838 (1996). Los procedimientos locales alinean secuencias identificando uno o más motivos conservados compartidos por todas las secuencias de entrada. Los procedimientos no limitantes incluyen, por ejemplo, Match-box, véase, por ejemplo, Eric Depiereux y Ernest Feytmans, Match-Box: A Fundamentally New Algorithm for the Simultaneous Alignment of Several Protein Sequences, 8(5) CABIOS 501-509 (1992); muestreo de Gibbs, véase, por ejemplo, C. E. Lawrence y col., Detecting Subtle Sequence Signals: A Gibbs Sampling Strategy for Multiple Alignment, 282(5131) Science 208-214 (1993); Align-M, véase, por ejemplo, Ivo Van Walle y col., Align-M - A New Algorithm for Multiple Alignment of Highly Divergent Sequences, 20(9) Bioinformatics: 1428-1435 (2004).

**[0177]** Por lo tanto, el porcentaje de identidad de secuencias se determina mediante procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul y col., Bull. Math. Bio. 48: 603- 16, 1986 y Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-19, 1992. En resumen, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar las puntuaciones de alineamiento usando una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión

de hueco de 1 y la matriz de puntuación "blosum 62" de Henikoff y Henikoff (véase anteriormente) como se muestra más adelante (los aminoácidos se indican por los códigos convencionales de una letra).

**Puntuaciones de alineamiento para determinar la identidad de secuencia**

5

[0178]

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

10 [0179] La identidad en porcentaje se calcula entonces como:

$$\frac{\text{Número total de correspondencias idénticas}}{\text{[longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga con el fin de alinear las dos secuencias]}} \times 100$$

[0180] Los polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. Estos cambios son preferiblemente de menor naturaleza, es decir, sustituciones de



aminoácidos conservativas (véase a continuación) y otras sustituciones que no afectan significativamente el plegamiento o actividad del polipéptido; deleciones pequeñas, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y extensiones del extremo amino o carboxilo pequeñas tales como un residuo de metionina del extremo amino, un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o un marcador de 5 afinidad.

### Sustituciones de aminoácidos conservativas

#### [0181]

10

Básicos:	arginina lisina histidina
Ácidos:	ácido glutámico ácido aspártico
Polares:	glutamina asparagina
Hidrófobos:	leucina isoleucina valina
Aromáticos:	fenilalanina triptófano tirosina
Pequeños:	glicina alanina serina treonina metionina

[0182] Además de los 20 aminoácidos convencionales, los residuos de aminoácidos de los polipéptidos de la presente invención pueden estar sustituidos con aminoácidos no convencionales (tales como 4-hidroxi-prolina, 6-N-metil-lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y  $\alpha$ -metilserina). Los residuos de aminoácidos de polipéptido 15 clostridial pueden estar sustituidos con un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético y aminoácidos no naturales. Los polipéptidos de la presente invención también pueden comprender residuos de aminoácidos que no son de origen natural.

[0183] Los aminoácidos que no son de origen natural incluyen, sin limitación, trans-3-metilprolina, 2,4-metano- 20 prolina, cis-4-hidroxi-prolina, trans-4-hidroxi-prolina, N-metilglicina, alo-treonina, metil-treonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomo-cisteína, nitro-glutamina, homoglutamina, ácido pipercolico, terc-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenil-alanina, 4-azafenil-alanina y 4-fluorofenilalanina. En la técnica se conocen varios procedimientos para incorporar los residuos de aminoácidos que no son de origen natural en proteínas. Por ejemplo, puede emplearse un sistema *in vitro* en el que mutaciones terminadoras se suprimen usando ARNt supresores químicamente 25 aminoacilados. Se conocen en la técnica procedimientos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt. La transcripción y traducción de plásmidos que contienen mutaciones terminadoras se realiza en un sistema sin células que comprende un extracto de S30 de *E. coli* y enzimas disponibles en el mercado y otros reactivos. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véanse, por ejemplo, Robertson y col., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman y col., Methods Enzymol. 202:301, 1991; Chung y col., Science 259: 806-9, 1993; y Chung y col., Proc. Natl. Acad. 30 Sci. USA 90: 10145-9, 1993). En un segundo procedimiento, la traducción se realiza en ovocitos de *Xenopus* por microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti y col., J. Biol. Chem. 271: 19991-8, 1996). Dentro de un tercer procedimiento, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural que va a sustituirse (por ejemplo, fenilalanina) y en presencia del aminoácido o aminoácidos que no se producen naturalmente deseados (por ejemplo, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4- 35 fluorofenilalanina). El aminoácido que no se produce naturalmente se incorpora en el polipéptido en lugar de su homólogo natural. Véase, Koide y col., Biochem. 33: 7470-6, 1994. Los residuos de aminoácidos de origen natural pueden convertirse en especies que no se producen naturalmente por modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis dirigida a sitio para expandir adicionalmente el intervalo de sustituciones (Wynn y Richards, Protein Sci. 2: 395-403, 1993).

40

[0184] Los residuos de aminoácidos de polipéptidos de la presente invención pueden sustituirse con un número

limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no están codificados por el código genético, aminoácidos que no se producen naturalmente y aminoácidos no naturales.

**[0185]** Los aminoácidos esenciales en los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida a sitio o mutagénesis por barrido con alanina (Cunningham y Wells, Science 244: 1081-5, 1989). También pueden determinarse sitios de interacción biológica por análisis físico de la estructura, como se ha determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcado por fotoafinidad, junto con mutación de aminoácidos de sitios de contacto putativos. Véanse, por ejemplo, de Vos y col., Science 255: 306-12, 1992; Smith y col., J. Mol. Biol. 224: 899-904, 1992; Wlodaver y col., FEBS Lett. 309: 59-64, 1992. Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden deducirse a partir del análisis de homologías con componentes relacionados (por ejemplo, los componentes de translocación o de proteasa) de los polipéptidos de la presente invención.

**[0186]** Pueden hacerse y probarse múltiples sustituciones aminoacídicas usando procedimientos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241: 53-7, 1988) o Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-6, 1989). En resumen, estos autores desvelan procedimientos para aleatorizar de forma simultánea dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionando un polipéptido funcional, y después secuenciando los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros procedimientos que pueden usarse incluyen expresión en fago (por ejemplo, Lowman y col., Biochem. 30: 10832-7, 1991; Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire y col., Gene 46: 145, 1986; Ner y col., DNA 7: 127, 1988).

**[0187]** Pueden hacerse y probarse múltiples sustituciones aminoacídicas usando procedimientos conocidos de mutagénesis y cribado, tales como las desveladas por Reidhaar-Olson y Sauer (Science 241: 53-7, 1988) o Bowie y Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-6, 1989). En resumen, estos autores desvelan procedimientos para aleatorizar de forma simultánea dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionando un polipéptido funcional, y después secuenciando los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones permisibles en cada posición. Otros procedimientos que pueden usarse incluyen expresión en fago (por ejemplo, Lowman y col., Biochem. 30: 10832-7, 1991; Ladner y col., Patente de Estados Unidos N° 5.223.409; Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a región (Derbyshire y col., Gene 46: 145, 1986; Ner y col., DNA 7: 127, 1988).

### Resumen de Ejemplos

**[0188]**

- 35 Ejemplo 1 Preparación de una construcción estructural de LHA
- Ejemplo 2 Construcción de proteína de fusión de LH<sub>N</sub>/A-EGFv3
- Ejemplo 3 Expresión y purificación de una proteína de fusión de LH<sub>N</sub>/A-CT-EGF v3
- 40 Ejemplo 4 Ensayo de afinidad de unión a EGF
- Ejemplo 5 Ensayo de afinidad de unión a EGF
- Ejemplo 6 Tratamiento de un paciente que padece bronquitis crónica
- Ejemplo 7 Procedimiento para tratar pacientes acromegálicos resistentes a análogos de somatostatina
- Ejemplo 8 Procedimiento para suprimir células tumorales neuroendocrinas
- Ejemplo 9 Comparación de EGF y proteínas de fusión de EGF en un ensayo de activación del receptor de EGF
- 45 Ejemplo 10 Comparación de EGF, muteína del EGF y proteínas de fusión de EGF en un ensayo de activación del receptor de EGF
- Ejemplo 11 Tratamiento de un paciente que padece rinitis
- Ejemplo 12 Tratamiento de un paciente que padece asma
- 50 Ejemplo 13 Tratamiento de un paciente que padece EPOC
- Ejemplo 14 Tratamiento de un paciente que padece asma
- Ejemplo 15 Tratamiento de un paciente que padece cáncer de colon
- Ejemplo 16 Tratamiento de un paciente que padece psoriasis
- Ejemplo 17 Tratamiento de un paciente que padece eczema
- 55 Ejemplo 18 Tratamiento de un paciente que padece cáncer colorectal
- Ejemplo 19 Tratamiento de un paciente que padece cáncer de próstata
- Ejemplo 20 Tratamiento de un paciente que padece cáncer de pulmón de cnp
- Ejemplo 21 Tratamiento de un paciente que padece cáncer de mama

**Resumen de SEQ ID NO**

[0189]

- 5 SEQ ID 1 Secuencia aminoacídica para el factor de crecimiento epidérmico humano de origen natural (EGF)  
 SEQ ID 2 Secuencia de ADN de LHA  
 SEQ ID 3 Secuencia de ADN de LHB  
 SEQ ID 4 Secuencia de ADN de LHC  
 10 SEQ ID 5 Secuencia de ADN de LHD  
 SEQ ID 6 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N  
 SEQ ID 7 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v1  
 SEQ ID 8 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16Q  
 SEQ ID 9 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v2  
 15 SEQ ID 10 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49L  
 SEQ ID 11 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v3  
 SEQ ID 12 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49I  
 SEQ ID 13 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v4  
 SEQ ID 14 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49V  
 20 SEQ ID 15 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v5  
 SEQ ID 16 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49A  
 SEQ ID 17 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v6 (G12Q)  
 SEQ ID 18 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49G  
 SEQ ID 19 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v7 (H16D)  
 25 SEQ ID 20 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49S  
 SEQ ID 21 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v8 (Y13W)  
 SEQ ID 22 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49T  
 SEQ ID 23 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v9 (Q43A)  
 SEQ ID 24 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49N  
 30 SEQ ID 25 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v10 (H16A)  
 SEQ ID 26 Secuencia de proteínas de la variante de EGF W49Q  
 SEQ ID 27 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v11 (L15A)  
 SEQ ID 28 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49L  
 SEQ ID 29 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v12 (V19E)  
 35 SEQ ID 30 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16Q\_W49L  
 SEQ ID 31 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v13 (V34D)  
 SEQ ID 32 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49I  
 SEQ ID 33 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv1 (activación de Xa)  
 SEQ ID 34 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16Q\_W49I  
 40 SEQ ID 35 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv2 (activación de Xa)  
 SEQ ID 36 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W50A  
 SEQ ID 37 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv3  
 SEQ ID 38 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16Q\_W50A  
 SEQ ID 39 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv4  
 45 SEQ ID 40 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49L\_W50A  
 SEQ ID 41 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv5  
 SEQ ID 42 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16Q\_W49L\_W50A  
 SEQ ID 43 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv6  
 SEQ ID 44 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49I\_W50A  
 50 SEQ ID 45 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv7  
 SEQ ID 46 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16Q\_W49I\_W50A  
 SEQ ID 47 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv8  
 SEQ ID 48 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49L\_W50A\_E24G  
 SEQ ID 49 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv9  
 55 SEQ ID 50 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25T  
 SEQ ID 51 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv10  
 SEQ ID 52 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25S  
 SEQ ID 53 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv11  
 SEQ ID 54 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25T\_K28R

- SEQ ID 55 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv12  
 SEQ ID 56 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25T\_K28R\_S4P  
 SEQ ID 57 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv13  
 5 SEQ ID 58 Secuencia de proteínas de la variante de EGF H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25T\_K28R\_S4P\_E5K  
 SEQ ID 59 Secuencia de proteínas de LHB-EGFv1  
 SEQ ID 60 Secuencia de proteínas de la variante de EGF v3  
 SEQ ID 61 Secuencia de proteínas de LHB-EGFv5  
 SEQ ID 62 Secuencia de proteínas del tétanos LHN-EGFv1  
 10 SEQ ID 63 Secuencia de proteínas de LHD-EGFv6 (sitio sensible a proteasa)  
 SEQ ID 64 Secuencia de proteínas de LHD-EGFv3  
 SEQ ID 65 Secuencia de proteínas de LHD-EGFv11  
 SEQ ID 66 Secuencia de proteínas de M26- IgA1- HC- EGFv3  
 SEQ ID 67 Secuencia de proteínas de M26- IgA1- HC- EGFv11  
 15 SEQ ID 68 Secuencia de proteínas del tétanos LHN-EGFv3  
 SEQ ID 69 Secuencia de proteínas de LHA-CP-EGFv2  
 SEQ ID 70 Secuencia de proteínas de LHD-EGFv2  
 SEQ ID 71 Secuencia de proteínas de LHC-CP-EGFv2  
 SEQ ID 72 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv3  
 20 SEQ ID 73 Secuencia de ADN de una variante de EGF v3

**[0190]** La figura 1 ilustra los datos generados en el Ejemplo 10 en el que se comprueba la capacidad (a concentraciones crecientes) de activar un receptor del EGF del EGF, muteína del EGF o la proteína de fusión a muteína de EGF. Un valor de  $pEC_{50}$  bajo indica una activación del receptor relativamente deficiente.

25 **[0191]** La figura 2 ilustra un modelo tridimensional de la unión EGF-EGF<sup>R</sup>, en la que se identifican la Interfaz de Unión 1 (residuos 31-40 de EGF), la Interfaz de Unión 2 (residuos 41-45 de EGF), y el Extremo de Avance (residuos 48-51 en combinación con 15-17 de EGF).

### 30 Ejemplo 1 Preparación de una construcción estructural de LHA

**[0192]** El siguiente procedimiento crea un clon para su uso como una estructura de expresión para la expresión de proteínas de múltiples dominios. Este ejemplo se basa en la preparación de un clon basado en el serotipo A (SEQ ID 2), aunque los procedimientos son igualmente aplicables a todos los serotipos de LH<sub>N</sub> tales como serotipo B (SEQ ID 3), serotipo C (SEQ ID 4) y serotipo D (SEQ ID 5).

#### *Preparación de vectores de clonación y de expresión*

40 **[0193]** pCR 4 (Invitrogen) es el vector de clonación estándar elegido debido a la falta de secuencias de restricción dentro del vector y sitios de cebadores de secuenciación adyacentes para la fácil confirmación de la construcción. El vector de expresión se basa en el vector de expresión pET (Novagen) que tiene las secuencias de restricción deseadas en el sitio de clonación múltiple en la orientación correcta para la inserción de la construcción (*NdeI-BamHI-Sall-PstI-XbaI-HindIII*). Un fragmento del vector de expresión se ha eliminado para crear un plásmido no movilizable y se han insertado una diversidad de diferentes marcas de fusión para aumentar las opciones de  
 45 purificación.

#### *Preparación de LcA*

50 **[0194]** La secuencia de ADN está diseñada por retro-traducción de la secuencia aminoacídica de LC/A (obtenida de fuentes de bases de datos libremente disponibles tales como GenBank (número de acceso P10845) usando una de una diversidad de herramientas de software de traducción inversa (por ejemplo, la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)). Las secuencias de reconocimiento de BamHI/Sall se incorporan en los extremos 5' y 3' respectivamente de la secuencia manteniendo el correcto marco de lectura. La secuencia de ADN se criba (usando el software tal como SeqBuilder, DNASTAR Inc.) para secuencias de escisión con enzimas de restricción  
 55 incorporadas durante la retro-traducción. Cualquier secuencia de escisión que se encuentre que es común a las requeridas por el sistema de clonación se elimina por la herramienta Backtranslation de la secuencia codificante propuesta, asegurando que se mantiene el uso de codones de *E. coli* común. El uso de codones de *E. coli* se evalúa por referencia a programas de software tales como Graphical Codon Usage Analyser (GeneArt), y el % de contenido de GC y la relación del uso de codones se evalúan por referencia a tablas de uso de codones publicadas (por

ejemplo, GenBank edición 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada que contiene el marco de lectura abierto (ORF) de LC/A se sintetiza entonces comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, GeneArt o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR 4.

#### 5 Preparación del inserto de $H_N/A$

**[0195]** La secuencia de ADN está diseñada por retro-traducción de la secuencia aminoacídica de  $H_N/A$  (obtenida de fuentes de bases de datos libremente disponibles tales como GenBank (número de acceso P10845) usando una de una diversidad de herramientas de software de traducción inversa (por ejemplo, la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)). Una secuencia de restricción de *Pst*I se añadió al extremo N y *Xba*I-codón de terminación-HindIII al extremo C, asegurando que se mantuviera en el marco de lectura correcto. La secuencia de ADN se criba (usando software tal como SeqBuilder, DNASTAR Inc.) para secuencias de escisión con enzimas de restricción incorporadas durante la retro-traducción. Cualquier secuencia que se encuentre que es común a aquellas requeridas por el sistema de clonación se elimina por la herramienta Backtranslation de la secuencia codificante propuesta asegurando que se mantiene el uso de codones de *E. coli* común. El uso de codones de *E. coli* se evalúa por referencia a programas de software tales como Graphical Codon Usage Analyser (GeneArt), y el % de contenido de GC y la relación del uso de codones se evalúan por referencia a tablas de uso de codones publicadas (por ejemplo, GenBank edición 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada se sintetiza entonces comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, GeneArt o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR4.

#### 20 Preparación del interdominio (enlazador de LC- $H_N$ )

**[0196]** El enlazador de LC- $H_N$  puede diseñarse a partir del primer principio, usando la información de secuencias existente para el enlazador como plantilla. Por ejemplo, el enlazador de serotipo A (en este caso definido con la región de polipéptidos entre dominios que existe entre las cisteínas del puente disulfuro entre LC y  $H_N$ ) tiene la secuencia VRGIIPFKTKSLDEGYNKALNDL. Esta información de secuencia está libremente disponible de fuentes de base de datos disponibles tales como GenBank (número de acceso P10845). Por ejemplo, un enlazador alternativo puede usarse compuesto por un enlazador Glicina-Serina (GGGS<sub>3</sub>). Para la generación de un sitio de escisión por proteasa específico, la secuencia de reconocimiento nativa para el factor Xa (IEGR o IDGR) puede usarse, por ejemplo, en la secuencia modificada VDGIITSKTKSLIDGR o GGGGSGGGGSGGGGSIEGRGGGGSGGGGSGGGGS o GGGGSGGGGSGGGGSIEGR, o la secuencia de reconocimiento para la Cadena de Luz de la Enterocinasa (DDDDK) puede insertarse, por ejemplo, en el bucle de activación para generar la secuencia VDGIITSKTKSLDDDDK o GGGGSGGGGSGGGGSDDDDKGGGGSGGGGSGGGGS.

**[0197]** Usando una de una variedad de herramientas de software de traducción inversa (por ejemplo, la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)) se determina la secuencia de ADN que codifica la región de enlazador. Las secuencias de la enzima de restricción *Bam*HI/*Sal*I y *Pst*I/*Xba*I/codón de terminación/HindIII se incorporan en cualquier extremo, en los marcos de lectura correctos. La secuencia de ADN se criba (usando software tal como Seqbuilder, DNASTAR Inc.) para secuencias de escisión con enzimas de restricción incorporadas durante la retro-traducción. Cualquier secuencia que se encuentre que es común a aquellas requeridas por el sistema de clonación se elimina por la herramienta Backtranslation de la secuencia codificante propuesta, asegurando que se mantiene el uso de codones de *E. coli* común. El uso de codones de *E. coli* se evalúa por referencia a programas de software tales como Graphical Codon Usage Analyser (GeneArt), y el % de contenido de GC y la relación del uso de codones se evalúan por referencia a tablas de uso de codones publicadas (por ejemplo, GenBank edición 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada se sintetiza entonces comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, GeneArt o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR 4. Si se desea clonar el enlazador fuera del vector pCR 4, el vector se escinde con enzimas de restricción de combinación *Bam*HI + *Sal*I o *Pst*I + *Xba*I. Entonces, este vector escindido sirve como el vector receptor para la inserción y el ligado del ADN de LC (escindido con *Bam*HI/*Sal*I) o ADN de  $H_N$  (escindido con *Pst*I/*Xba*I) de (SEQ ID 2). Una vez que el ADN que codifica LC o  $H_N$  se inserta en la dirección 5' o 3' del ADN del enlazador, todo el fragmento de ADN de LC-enlazador o enlazador- $H_N$  puede aislarse y transferirse al clon de estructura.

#### 55 Ensamblaje y confirmación del clon de estructura

**[0198]** El LC-enlazador o el enlazador- $H_N$  se corta fuera del vector de clonación pCR 4 usando enzimas de restricción *Bam*HI/*Pst*I o *Sal*I/*Xba*I o productos de digestión *Xho*I/NotI, respectivamente. El vector de expresión pET que contiene LH<sub>N</sub>/A (SEQ ID 2) se digiere con las mismas enzimas pero también se trata con fosfatasa antártica como precaución extra para evitar la re-circulación. La región LC-enlazador o enlazador- $H_N$  y la estructura del vector

pET se purifican en gel. El inserto purificado y la estructura del vector se ligan entre sí usando T4 ADN ligasa, y el producto se transforma con células TOP10 que después se criban para la inserción LC-enlazador o enlazador-H<sub>N</sub> usando enzimas de restricción *Bam*HI/*Sa*II o *Bam*HI/*Pst*I o *Xho*I/*Not*I para asegurar que la estructura final es la correcta. La integridad del ADN del ORF se comprueba por secuenciación.

5

### Ejemplo 2 Construcción del vector de expresión LH<sub>N</sub>/A-EGFv3

[0199] El siguiente procedimiento crea un clon para su uso como una construcción de expresión para la expresión de fusión de múltiples dominios. Este ejemplo se basa en la preparación de una proteína de fusión de EGFv3 (por ejemplo, SEQ ID 37), aunque los procedimientos son igualmente aplicables a todas las variantes de la presente invención, así como a otros serotipos LH<sub>N</sub> tales como proteínas de fusión de serotipo B (SEQ ID 3), serotipo C (SEQ ID 4) y serotipo D (SEQ ID 5) de la presente invención.

*Preparación del inserto de separador-EGFv3*

15

#### SEPARADOR DE ACTIVACIÓN

[0200] Para la presentación de una secuencia de variante de EGF en el extremo C del dominio H<sub>N</sub>, se diseña una secuencia de ADN para flanquear las regiones de separador y resto diana (RD) que permiten la incorporación en el clon de estructura (SEQ ID 1). La secuencia de ADN puede disponerse como *Bam*HI-*Sa*II-*Pst*I-*Xba*I-separador-EGFv3-codón de terminación-*Hind*III. La secuencia de ADN puede diseñarse usando una de una diversidad de herramientas de software de traducción inversa (por ejemplo, EditSeq, mejor traducción inversa de *E. coli* (DNASTAR Inc.), o la herramienta Backtranslation v2.0 (Entelechon)). Una vez se ha diseñado el ADN de RD, el ADN adicional requerido para codificar el separador preferido se crea por ordenador. Es importante garantizar que el marco de lectura correcto se mantiene para el separador, EGFv3 y las secuencias de restricción, y que la secuencia de *Xba*I no está precedida por las bases TC, lo que produciría la metilación de DAM. La secuencia de ADN se criba para secuencias de restricción incorporadas y cualquier secuencia adicional se elimina manualmente de la secuencia restante asegurando que se mantiene el uso de codones de *E. coli* común. El uso de codones de *E. coli* se evalúa por referencia a programas de software tales como Graphical Codon Usage Analyser (GeneArt), y el % de contenido de GC y la relación del uso de codones se evalúan por referencia a tablas de uso de codones publicadas (por ejemplo, GenBank edición 143, 13 de septiembre de 2004). Esta secuencia de ADN optimizada se sintetiza entonces comercialmente (por ejemplo, por Entelechon, GeneArt o Sigma-Genosys) y se proporciona en el vector pCR 4.

35 *Inserción del separador-EGFv3 en la estructura*

[0201] Con el fin de crear una construcción de LC-enlazador-H<sub>N</sub>-separador-EGFv3 usando la construcción de estructura (SEQ ID 1) y el vector pCR 4-separador-RD que codifica el RD de EGFv3 (SEQ ID 73), se emplea el siguiente procedimiento de dos etapas. En primer lugar, el dominio H<sub>N</sub> se corta del clon de la estructura usando las enzimas de restricción *Pst*I y *Xba*I y se liga a vector pCR 4-separador-EGFv3 digerido de forma similar. Esto crea un ORF H<sub>N</sub>-separador-EGFv3 en pCR 4 que puede cortarse del vector usando las enzimas de restricción *Pst*I y *Hind*III para el posterior ligado en la construcción de estructura o de expresión escindida de forma similar. La construcción final contiene el ORF LC-enlazador-H<sub>N</sub>-separador-EGFv3 para la transferencia en vectores de expresión para su expresión para producir una proteína de fusión de la secuencia (por ejemplo, SEQ ID 37).

45

[0202] El cribado con enzimas de restricción es suficiente para asegurar que la estructura final es correcta ya que se ha confirmado que todos los componentes se han secuenciado, durante la síntesis o tras la amplificación por PCR. Sin embargo, durante la subclonación de algunos componentes en la estructura, donde se eliminan y se insertan fragmentos de tamaño similar, se requiere la secuenciación de una región pequeña para confirmar que la inserción es correcta.

50

### Ejemplo 3 Expresión y purificación de una proteína de fusión de LH<sub>N</sub>/A-CT-EGF v3

[0203] Este ejemplo se basa en la preparación de una fusión de CT-EGF-A activada por el Factor Xa, aunque los procedimientos son igualmente aplicables a cualquier otra proteína de fusión de la presente invención.

*Expresión de una proteína de fusión de LH<sub>N</sub>/A-CT-EGF v3*

[0204] La expresión de la fusión de CT-EGF v3-A activada por la proteína de fusión de Factor Xa se logra usando

el siguiente protocolo. Se inoculan 100 ml de TB modificado que contiene glucosamina al 0,2% y 30 µg/ml de kanamicina en un matraz de 250 ml con una única colonia de la fusión CT-EGF v3-A. Se cultiva el cultivo a 37 °C, 225 rpm durante 16 horas. Se inocula 1 l de TB modificado que contiene glucosamina al 0,2% y 30 µg/ml de kanamicina en un matraz de 2 l con 10 ml de cultivo durante una noche. Se cultivan los cultivos a 37 °C hasta que se alcance una DO<sub>600 nm</sub> aproximada de 0,5, momento en el que se reduce la temperatura a 16 °C. Después de 1 hora, se inducen los cultivos con IPTG 1 mM y se cultivan a 16 °C durante 16 horas más.

#### Purificación de la fusión CT-EGF v3-A

10 **[0205]** Se descongela el tubo Falcon que contiene 35 ml de HEPES 50 mM a pH 7,2, NaCl 200 mM y aproximadamente 10 g de pasta de células BL21 (DE3) de *E. coli*. Se homogeniza la pasta de células sobre hielo durante 30 segundos encendido, 30 segundos apagado durante 10 ciclos a una potencia de 22 micrómetros asegurando que la muestra sigue fría. Se centrifugan las células lisadas a 18.000 rpm, 4 °C durante 30 minutos. Se carga el sobrenadante sobre una columna quelante cargada con NiSO<sub>4</sub> 0,1 M (es suficiente una columna de 20-30 15 ml) equilibrada con HEPES 50 mM a pH 7,2, NaCl 200 mM. Se usa un gradiente de etapas de imidazol 40 y 100 mM, se lava la proteína unida no específica y se eluye la proteína de fusión con imidazol 200 mM. La proteína de fusión eluida se dializa contra 5 l de HEPES 50 mM a pH 7,2, NaCl 200 mM a 4 °C durante una noche y se mide la DO de la proteína de fusión dializada. Se añaden 10 mg de Factor Xa por 1 mg de proteína de fusión y se incuba estáticamente durante una noche a 25 °C. Se carga sobre una columna quelante cargada con NiSO<sub>4</sub> 0,1 M (es 20 suficiente una columna de 20-30 ml) equilibrada con HEPES 50 mM a pH 7,2, NaCl 200 mM. Se lava la columna hasta el nivel inicial con HEPES 50 mM a pH 7,2, NaCl 200 mM. Se usa un gradiente de etapas de imidazol 40 y 100 mM, se lava la proteína unida no específica y se eluye la proteína de fusión con imidazol 200 mM. Se dializa la proteína de fusión eluida contra 5 l de HEPES 50 mM a pH 7,2, NaCl 150 mM a 4 °C durante una noche y se concentra la fusión a aproximadamente 2 mg/ml, se toman alícuotas de muestra y se congelan a -20 °C. Se prueba 25 la proteína purificada usando DO, BCA y análisis de pureza.

#### **Ejemplo 4 Ensayo de afinidad de unión a EGF**

**[0206]** Para comparar la afinidad de unión de variantes de EGF a wtEGF, una célula (NR6, una línea celular de 30 fibroblastos murinos derivada de 3T3; WT-EGF) que carece de receptor de EGF endógeno (ErbB:- EGFR) se transfecta de forma estable con EGFR humano de tipo natural para generar WT+EGF. Antes de realizar los ensayos de unión, las células confluentes de WT - EGF se desalojaron de las placas de cultivo tisular con Verseno. La unión de la competencia de EGF se midió de dos maneras de asegurar que se había logrado un equilibrio: se incubaron 5 x 10<sup>4</sup> células NR6 WT durante 30 min a 4 °C, y se añadió EGF marcado con Alexa-488 de tipo natural durante 30 35 min a 4°C. Se añadieron concentraciones crecientes de EGF no marcado de tipo natural o mutantes, y las muestras se incubaron durante 6 h a 4 °C, con mezclado constante. Como alternativa, las concentraciones crecientes de EGF no marcado de tipo natural y mutantes se añadieron en primer lugar a las células durante 30 min a 4 °C, y se añadió EGF Alexa-488 de tipo natural durante 6 h más a 4 °C. La intensidad de la fluorescencia del marcado del EGF Alexa-488 de tipo natural de la superficie celular se midió por citometría de flujo. Los ensayos de unión se realizaron en 40 PBS suplementado con 1 mg/ml de BSA (pH 7,4), en condiciones en las que la depleción del ligando no tenía importancia. Curvas de unión de competencia se ajustaron usando una ecuación de unión de cuatro puntos. La desviación típica representa experimentos de unión repetidos realizados al menos por triplicado en días diferentes usando dos preparaciones de proteínas diferentes.

#### 45 **Ejemplo 5 Ensayo de afinidad de unión a EGF**

**[0207]** Para comparar la afinidad de unión de las variantes de EGF para el receptor del EGF se determinó la afinidad midiendo su competencia con <sup>125</sup>I-rEGF (EGF recombinante) para la unión en células A431 fijadas en paraformaldehído, un sistema en el que los procesos de internalización del ligando y el receptor se inhiben de este 50 modo. Se usó rEGF puro como un estándar. Las células A431 se cultivaron hasta su confluencia en placas de 96 pocillos y después se fijaron el día del ensayo con paraformaldehído al 3% en PBS. Las variantes de EGF y rEGF se diluyeron en serie con <sup>125</sup>I-rEGF 1,0 nM en PBS que contenía BSA al 0,1%. Después, se realizaron incubaciones a 37 °C durante 2 horas y antes cada pocillo se lavó 3 veces con PBS que contenía 0,15 mg/ml de BSA. Finalmente los pocillos se partieron y se contaron directamente en un contador gamma. 55

#### **Ejemplo 6 Tratamiento de un paciente que padece bronquitis crónica.**

**[0208]** Un hombre de 62 años que padece bronquitis crónica (VEF<sub>1</sub> reducido al 80% del valor predictivo normal; volumen de esputo diario de 30 ml) acude a su médico de cabecera. A pesar del tratamiento con esteroides

inhalados, el paciente presenta dificultad en la realización de las tareas cotidianas debido una continuada falta de aliento. El médico de cabecera le prescribe un tratamiento de seis meses de una proteína de fusión de muteína del EGF según la presente invención en forma de nebulizador, deben tomarse 80 µg mensualmente. Tras la discusión con el médico, el paciente selecciona el nebulizador más apropiado para su situación personal entre una gama de dispositivos adecuados. Después de una sola dosis de la proteína de fusión basada en EGF experimenta una reducción del volumen de esputo (a 15 ml) y una mejora del VEF1 (al 90%).

**Ejemplo 7 Procedimiento para tratar pacientes acromegálicos resistentes a análogos de somatostatina**

10 **[0209]** Después del control con éxito durante seis años de la HC e IGF-1 circulantes por análogos de la somatostatina (SSA), una tarotista ferial acromegálica de 60 años informe de piel grasa cada vez más evidente y también de un olor corporal notable como resultado de la hiperhidrosis. Es intolerante a la glucosa y tiene elevados niveles IGF-1 circulante y el aumento de la dosis de SSA no los controla. Es tratada por una inyección localizada de una proteína de fusión de muteína del EGF de acuerdo con la presente invención. En 14 días, la paciente informa de  
 15 una reducción significativa de la sudoración. Durante el mes siguiente su piel aceitosa vuelve a la normalidad y en este momento sus niveles de HC e IGF-1 están dentro del intervalo normal. Esta situación se mantiene los próximos cinco años.

**Ejemplo 8 Procedimiento para suprimir células tumorales neuroendocrinas**

20 **[0210]** Un miembro masculino de 35 años de un equipo regional de bádminton se somete a una radiografía de la columna vertebral por un dolor lumbar. El médico aprecia un crecimiento anormal del hueso y, durante el interrogatorio, el hombre informa de cada vez más incidentes de apnea del sueño y también de una piel cada vez más aceitosa. El médico recomienda la medición de los niveles de IGF-1 circulante y estos se encuentran elevados.  
 25 Las pruebas posteriores también muestran niveles de HC circulante por encima de normal por lo que se realiza una IRM craneal. Esto muestra un tumor pituitario de 9 mm de diámetro. El paciente es tratado con una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención por inyección. A intervalos de 1 semana se miden los niveles de IGF-1 circulante y se consideran menores a los de la primera medición y que se reducen de forma constante a un 15% por encima de lo normal durante las siguientes seis semanas. El nivel de HC circulante se encuentra normal en  
 30 este momento. Una dosis adicional de la medicación con mediciones de IGF-1 cada dos semanas muestra que esta hormona se ha estabilizado en el extremo superior de la normalidad. A las seis semanas después del segundo tratamiento, una exploración por IRM craneal revela una contracción del tumor a 6 mm. La terapia se ha continuado a una dosificación reducida a intervalos de dos meses con los niveles de IGF-1 y HC medidos en la séptima semana. Ambos están estables en el intervalo normal y la apnea del sueño y piel aceitosa ahora han desaparecido.  
 35 radiografía de la columna vertebral al año siguiente del primer tratamiento no muestra aumento del tamaño del hueso a partir de la observación original.

**Ejemplo 9 Comparación de EGF y proteínas de fusión de EGF en un ensayo de activación del receptor de EGF**

40 **[0211]** Se incubaron células A431 ( $1 \times 10^5$ ) con concentraciones crecientes de EGF, SXN100516 (LH<sub>N</sub>/A- EGF), SXN100988 (LH<sub>N</sub>/B- EGF) o SXN100501 (LH<sub>N</sub>/C- EGF) durante 20 min a 37 °C.

45 **[0212]** Las células se lavaron con PBS enfriado con hielo y se concentraron. Los lisados se diluyeron 1:10 antes de medir el nivel del receptor ErbB1 fosforilado usando un inmunoensayo tipo sandwich y una plataforma MSD.

Cálculos de pEC <sub>50</sub> de moléculas de Sintaxina en el receptor ErbB1 de células A431	
Agonista/Quimera SXN	pEC <sub>50</sub> ± e.t. media
EGF <i>per se</i>	9,13 ± 0,13
proteína de fusión SXN100501	7,15 ± 0,11
proteína de fusión SXN100516	7,47 ± 0,16
proteína de fusión SXN100988	7,61 ± 0,19

**Ejemplo 10 Comparación de EGF, muteína del EGF y proteínas de fusión de EGF en un ensayo de activación del receptor de EGF**

50 **[0213]** Se incubaron células A431 ( $1 \times 10^5$ ) con concentraciones crecientes de proteína de fusión de muteína de



EGF Sintaxina o EGF durante 20 min a 37 °C en tubos eppendorf por triplicado. Después del lavado, las células se lisaron y los lisados se añadieron a placas de 96 pocillos MSD recubiertas por un anticuerpo de captura específico para phosphoY1068 del receptor de EGF.

- 5 **[0214]** Tras la incubación, las placas se lavaron y se incubaron con un anticuerpo del receptor de EGF anti-fosfo marcado con un MSD SULFO-TAG electroquimioluminiscente. Se añadió un tampón de lectura MSD a la placa y la luz emitida de cada pocillo de la placa (URL) se midió en el MSD sector imager 6000.

Moléculas y quimeras de Sintaxina ensayadas

10

**[0215]**

Número SXN/ligando	Lote	Construcción
SXN101181	LC080805	pK7-Hx-EGFv3
SXN101784	OW090711	p K7-LcA-XA-HnA-EGFv3-10HT
SXN101886	JW090728B	pK7-6HT-Xa-LC-Xa-HC-GS20-EGFv3N16Y
SXN101887	JW090729	pK7-6HT-Xa-LC-Xa-HC-GS20-EGFv3L49W

Resultados (véase la figura 1)

15

**[0216]**

Ligando/Quimera	pEC <sub>50</sub>
EGF	8,74 ± 0,04
EGFv3	7,61
SXN101181	8,47 ± 0,08
SXN101784	8,13
SXN101886	7,04
SXN101887	7,69

- 20 **[0217]** No hay una diferencia significativa en el pEC<sub>50</sub> de SXN101181 en comparación con el EGF (p>0,05, prueba t).

**[0218]** Se observó una diferencia de la unidad logarítmica en la potencia (pEC<sub>50</sub>) entre el EGF (8,74 ± 0,04) y el EGFv3 (7,61).

## 25 Ejemplo 11 Tratamiento de un paciente que padece rinitis

- 30 **[0219]** Una mujer de 24 años que presenta anualmente síntomas típicos de rinitis alérgica estacional es tratada mediante administración local (por aerosol nasal) con una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En 2 a 7 días la paciente informa de una disminución de los síntomas. El efecto se mantiene durante el resto de la temporada de alergias.

## Ejemplo 12 Tratamiento de un paciente que padece asma

- 35 **[0220]** Una mujer de 43 años con una calidad de vida reducida debido a asma crónico es tratada por inyección sistémica de una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En 3 a 7 días los síntomas de la paciente los síntomas de la paciente han desaparecido y la paciente puede respirar más libremente. El efecto se mantiene durante 2 a 3 meses, después de lo cual se repite el tratamiento y se mantiene la mejora de la calidad de vida de la paciente.

## 40 Ejemplo 13 Tratamiento de un paciente que padece EPOC

- 45 **[0221]** Un hombre de 64 años con enfermedad pulmonar obstructiva crónica que tiene una calidad de vida reducida debido a la incapacidad para respirar de forma eficaz es tratado por administración local (mediante aerosol) de una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En 2 a 5 días el paciente ha eliminado la mayor parte del exceso de mucosidad de las vías respiratorias y puede respirar más libremente. El efecto se mantiene durante 2 a 3 meses, después de lo cual se repite el tratamiento y se mantiene la mejora de la calidad de

vida del paciente.

**Ejemplo 14 Tratamiento de un paciente que padece asma**

5 **[0222]** Un hombre de 25 años con una exacerbación severa de sus síntomas asmáticos debido a una infección por rinovirus es tratado por administración local (inhalación por aerosol) con una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En 2 a 7 días el paciente informa de una reducción de mucosidad en las vías respiratorias y la exacerbación cede.

10 **Ejemplo 15 Tratamiento de un paciente que padece cáncer de colon**

**[0223]** Un paciente varón de 32 años con ictericia es diagnosticado con carcinoma hepatocelular avanzado que se ha extendido al colon. El paciente es tratado con una inyección sistémica de una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En dos a tres semanas el crecimiento de los tumores metastásicos se ha detenido.

15 Dos meses después del tratamiento los tumores han disminuido de tamaño y la ictericia ha desaparecido. Una segunda aplicación del tratamiento continúa la disminución del tamaño del tumor y mantiene el alivio de los síntomas.

**Ejemplo 16 Tratamiento de un paciente que padece psoriasis**

20

**[0224]** Un paciente varón de 32 diagnosticado con psoriasis y que experimenta molestias físicas significativas de prurito y rascado de las zonas afectadas de su espalda y brazos es tratado mediante la administración tópica con una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En 2 a 7 días los síntomas se alivian y el efecto dura de 1 a 2 meses. Una segunda aplicación del tratamiento mantiene el alivio de los síntomas.

25

**Ejemplo 17 Tratamiento de un paciente que padece eczema**

**[0225]** Un paciente varón de 45 diagnosticado con eczema y que experimenta molestias físicas significativas de prurito y rascado de las zonas afectadas de sus glúteos y piernas es tratado mediante administración tópica con una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En 2 a 7 días los síntomas se alivian y el efecto dura de 1 a 2 meses. Una segunda aplicación del tratamiento mantiene el alivio de los síntomas.

30

**Ejemplo 18 Tratamiento de un paciente que padece cáncer colorectal**

35 **[0226]** Un hombre de 70 años es diagnosticado con cáncer colorectal (estadio IV). No se recomienda la cirugía. Después del tratamiento con una inyección sistémica de una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención los tumores metastásicos han dejado de aumentar de tamaño. En un mes los tumores han disminuido de tamaño y el paciente dice sentirse mejor. Una segunda aplicación del tratamiento reduce adicionalmente el tamaño del tumor y mantiene el alivio de los síntomas.

40

**Ejemplo 19 Tratamiento de un paciente que padece cáncer de próstata**

**[0227]** Un hombre de 46 años es diagnosticado con cáncer de próstata con metástasis a las vértebras. Se queja de dolores en la columna vertebral y la pelvis. Puesto que la cirugía es inapropiada, el paciente es tratado con una inyección sistémica de una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En dos semanas los tumores han disminuido de tamaño y el paciente informa de menos dolor. Una segunda aplicación del tratamiento continúa la disminución del tamaño del tumor y mantiene el alivio de los síntomas.

45

**Ejemplo 20 Tratamiento de un paciente que padece cáncer de pulmón de cnp**

50

**[0228]** Una mujer de 46 años es diagnosticada con carcinoma de pulmón de células no pequeñas (estadio IV) con un pronóstico del 2% de probabilidades de vivir dos años. La paciente es tratada con una inyección sistémica de una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En dos semanas la velocidad de crecimiento de los tumores metastásicos se ha detenido. Dos meses después del tratamiento los tumores han disminuido de tamaño y la paciente se siente mejor. Una segunda aplicación del tratamiento continúa disminuyendo el tamaño del tumor y mantiene el alivio de los síntomas. La paciente aumenta sus probabilidades de supervivencia más allá de dos años.

55

**Ejemplo 21 Tratamiento de un paciente que padece cáncer de mama**

**[0229]** Una paciente mujer de 36 años con ictericia es diagnosticada con cáncer avanzado de mama que se ha diseminado al hígado. La paciente es tratada con una inyección sistémica de una proteína de fusión de muteína del EGF de la presente invención. En dos semanas la velocidad de crecimiento del tumor metastático se ha detenido. Dos meses después del tratamiento los tumores han disminuido de tamaño y la ictericia ha desaparecido. Una segunda aplicación del tratamiento continúa la disminución del tamaño del tumor y mantiene el alivio de los síntomas.

**SEQ ID NO**

10 **[0230]**

SEQ ID 1 Secuencia aminoacídica para el factor de crecimiento epidérmico humano de origen natural (EGF)  
NSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

15 SEQ ID 2 Secuencia de ADN de LHA

ATGGAGTTCGTTAACAAACAGTTCAACTATAAAGACCCAGTTAACGGTGTTGACATTGCTT  
ACATCAAAATCCCGAACGCTGGCCAGATGCAGCCGGTAAAGGCATTCAAAATCCACAACA  
AAATCTGGGTTATCCCGAACGTGATACCTTTACTAACCCGGAAGAAGGTGACCTGAACC  
CGCCACCGGAAGCGAAACAGGTGCCGGTATCTTACTATGACTCCACCTACCTGTCTACC  
GATAACGAAAAGGACAACCTACCTGAAAGGTGTTACTAACTGTTGAGCGTATTTACTCC  
ACCGACCTGGGCCGTATGCTGCTGACTAGCATCGTTCCGGTATCCCGTTCTGGGGCGG  
TTCTACCATCGATACCGAACTGAAAGTAATCGACACTAACTGCATCAACGTTATTCAGCCG  
GACGGTTCCTATCGTTCCGAAGAACTGAACCTGGTGATCATCGGCCCGTCTGCTGATATC  
ATCCAGTTCGAGTGTCTGAGCTTTGGTCACGAAGTTCTGAACCTCACCCGTAACGGCTAC  
GGTCCACTCAGTACATCCGTTTCTCTCCGGACTTCACCTTCGGTTTTGAAGAATCCCTG  
GAAGTAGACACGAACCCACTGCTGGGCGCTGGTAAATTCGCAACTGATCCTGCGGTTAC  
CCTGGCTCACGAAGTTCATGCAGGCCACCGCCTGTACGGTATCGCCATCAATCCGA  
ACCGTGTCTTCAAAGTTAACACCAACGCGTATTACGAGATGTCCGGTCTGGAAGTTAGCT  
TCGAAGAACTGCGTACTTTTGGCGGTACGACGCTAAATTCATCGACTCTCTGCAAGAAA  
ACGAGTTCGGTCTGTACTACTATAACAAGTTCAAAGATATCGCATCCACCCTGAACAAAGC

GAAATCCATCGTGGGTACCACTGCTTCTCTCCAGTACATGAAGAACGTTTTTAAAGAAAA  
TACCTGCTCAGCGAAGACACCTCCGGCAAATTCTCTGTAGACAAGTTGAAATTCGATAAA  
CTTTACAAAATGCTGACTGAAATTTACACCGAAGACAACCTTCGTTAAGTTCTTTAAAGTTCT  
GAACCGCAAAACCTATCTGAACTTCGACAAGGCAGTATTCAAATCAACATCGTGCCGAA  
AGTTAACTACACTATCTACGATGGTTTCAACCTGCGTAACACCAACCTGGCTGCTAATTTT  
AACGGCCAGAACACGGAAATCAACAACATGAACTTCACAAAACCTGAAAACTTCACTGGT  
CTGTTTCGAGTTTTACAAGCTGCTGTGCGTCGACGGCATCATTACCTCCAAAACCTAAATCT  
GACGATGACGATAAAAAACAAAGCGCTGAACTGACGTGTATCAAGGTTAACAACTGGGAT  
TTATTCTTCAGCCGAGTGAAGACAACCTTCACCAACGACCTGAACAAAGGTGAAGAAATC  
ACCTCAGATACTAACATCGAAGCAGCCGAAGAAAACATCTCGCTGGACCTGATCCAGCAG  
TACTACCTGACCTTTAATTTTCGACAACGAGCCGGAAAACATTTCTATCGAAAACCTGAGCT  
CTGATATCATCGGCCAGCTGGAACCTGATGCCGAACATCGAACGTTTCCCAAACGGTAAAA  
AGTACGAGCTGGACAAATATACCATGTTCCACTACCTGCGCGCGCAGGAATTTGAACACG  
GCAAATCCCGTATCGCACTGACTAACTCCGTTAACGAAGCTCTGCTCAACCCGTCCTCGTG  
TATACACCTTCTTCTAGCGACTACGTGAAAAAGGTCAACAAAGCGACTGAAGCTGCAA  
TGTTCTTGGGTTGGGTTGAACAGCTTGTTTATGATTTTACCGACGAGACGTCCGAAGTAT  
CTACTACCGACAAAATTGCGGATATCACTATCATCATCCCGTACATCGGTCCGGCTCTGA  
ACATTGGCAACATGCTGTACAAAAGACGACTTCGTTGGCGCACTGATCTTCTCCGGTGCG  
GTGATCCTGCTGGAGTTCATCCCGGAAATCGCCATCCCGGTACTGGGCACCTTTGCTCT  
GGTTTCTTACATTGCAAACAAGTTCTGACTGTACAAACCATCGACAACGCGCTGAGCAA  
ACGTAACGAAAAATGGGATGAAGTTTACAAATATATCGTGACCAACTGGCTGGCTAAGGT  
TAATACTCAGATCGACCTCATCCGCAAAAAATGAAAGAAGCACTGGAAAACAGGCCGGA  
AGCTACCAAGGCAATCATTAACCTACCAGTACAACCAGTACACCGAGGAAGAAAAAACAA  
CATCAACTTCAACATCGACGATCTGTCCTCTAAACTGAACGAATCCATCAACAAAGCTATG  
ATCAACATCAACAAGTTCCTGAACCAAGTCTGCTGTAAGCTATCTGATGAACTCCATGATCC  
CGTACGGTGTTAAACGTCTGGAGGACTTCGATGCGTCTCTGAAAGACGCCCTGCTGAAA  
TACATTTACGACAACCGTGGCACTCTGATCGGTGAGTTGATCGTCTGAAGGACAAAGTG  
ACAATACCTTATCGACCGACATCCCTTTTCAGCTCAGTAAATATGTGATAACCAACGCC  
TTTTGTCCACT

SEQ ID 3 Secuencia de ADN de LHB

ATGCCGGTTACCATCAACAACCTCAACTACAACGACCCGATCGACAACAACAACATCATT  
TGATGGAACCGCCGTTTCGCACGTGGTACCGGACGTTACTACAAGGCTTTTAAAGATCACC  
GACCGTATCTGGATCATCCCGGAACGTTACACCTTCGGTTACAAACCTGAGGACTTCAAC  
AAGAGTAGCGGGATTTTCAATCGTGACGTCTGCGAGTACTATGATCCAGATTATCTGAAT  
ACCAACGATAAGAAGAACATATTCCTTCAGACTATGATTAACCTTCAACCGTATCAAAA  
GCAAACCGCTCGGTGAAAACTCCTCGAAATGATTATCAACGGTATCCCGTACCTCGGTG

5

ACCGTCGTGTCCCGCTTGAAGAGTTCAACACCAACATCGCAAGCGTCACCGTCAACAAAC  
 TCATCAGCAACCCAGGTGAAGTCGAACGTAAAAAAGGTATCTTCGCAAACCTCATCATCT  
 TCGGTCCGGGTCCGGTCCCTCAACGAAAACGAAACCATCGACATCGGTATCCAGAACCAC  
 TTCGCAAGCCGTGAAGGTTTCGGTGGTATCATGCAGATGAAATTCTGCCCGGAATACGTC  
 AGTGTCTTCAACAACGTCCAGGAAAACAAAGGTGCAAGCATCTTCAACCGTCGTGGTTAC  
 TTCAGCGACCCGGCACTCATCCTCATGCATGAACTCATCCACGTCCTCCACGGTCTCTAC  
 GGTATCAAAGTTGACGACCTCCCGATCGTCCCGAACGAGAAGAAATTCTTCATGCAGAGC  
 ACCGACGCAATCCAGGCTGAGGAACTCTACACCTTCGGTGGCCAAGACCCAAGTATCAT  
 AACCCCGTCCACCGACAAAAGCATCTACGACAAAGTCCTCCAGAACTTCAGGGGTATCGT  
 GGACAGACTCAACAAAGTCCTCGTCTGCATCAGCGACCCGAACATCAATATCAACATATA  
 CAAGAACAAGTTCAAAGACAAGTACAAATTCGTCGAGGACAGCGAAGGCAAATACAGCAT  
 CGACGTAGAAAAGTTTCGACAAGCTCTACAAAAGCCTCATGTTTCGGTTTCACCGAAACCAA  
 CATCGCCGAGAACTACAAGATCAAGACAAGGGCAAGTTACTTCAGCGACAGCCTCCCGC  
 CTGTCAAATCAAGAACCTCTTAGACAACGAGATTTACACAATTGAAGAGGGCTTCAACAT  
 CAGTGACAAAGACATGGAGAAGGAATACAGAGGTCAGAACAAGGCTATCAACAAACAGG  
 CATAAGGAGATCAGCAAAGAACACCTCGCAGTCTACAAGATCCAGATGTGCGTCGAC  
 GGCATCATTACCTCCAAAATAAATCTGACGATGACGATAAAAACAAAGCGCTGAACCTG  
 CAGTGCATCGACGTTGACAACGAAGACCTGTTCTTCATCGCTGACAAAACAGCTTCAGT  
 GACGACCTGAGCAAAAACGAACGTATCGAATACAACACCCAGAGCAACTACATCGAAAAC  
 GACTCCCGATCAACGAACCTGATCCTGGACACCGACCTGATAAGTAAATCGAACTGCCG  
 AGCGAAAACACCGAAAAGTCTGACCGACTTCAACGTTGACGTTCCGGTTTACGAAAACAG  
 CCGGCTATCAAGAAAATCTTACCAGCAAAAACACCATCTTCCAGTACCTGTACAGCCAG  
 ACCTCCCGCTGGACATCCGTGACATCAGTCTGACCAGCAGTTTCGACGACGCTCTGCT  
 GTTCAGCAACAAAGTTTACAGTTTCTTACAGCATGGACTACATCAAACCGCTAACAAAGTT  
 GTTGAAGCAGGGCTGTTTCGCTGGTTGGTTAAACAGATCGTTAACGACTTCGTTATCGAA  
 GCTAACAAAAGCAACACTATGGACAAAATCGCTGACATCAGTCTGATCGTTCCGTACATC  
 GGTCTGGCTCTGAACGTTGGTAACGAAACCGCTAAAGGTAACTTTGAACCGCTTTCGAG  
 ATCGCTGGTGAAGCATCCTGCTGGAGTTCATCCCGAACTGCTGATCCCGGTTGTTGG  
 TGCTTTCCTGCTGGAAAGTTACATCGACAACAAAAACAAGATCATCAAACCATCGACAAC  
 GCTCTGACCAAACGTAACGAAAAATGGAGTGATATGTACGGTCTGATCGTTGCTCAGTGG  
 CTGAGCACCGTCAACACCCAGTTCTACACCATCAAAGAAGGTATGTACAAAGCTCTGAAC  
 TACCAGGCTCAGGCTCTGGAAGAGATCATCAAATACCGTTACAACATCTACAGTGAGAAG  
 GAAAAGAGTAACATCAACATCGACTTCAACGACATCAACAGCAAACCTGAACGAAGGTATC  
 AACAGGCTATCGACAACATCAACAACCTTCATCAACGGTTGCAGTGTTAGCTACCTGATG  
 AAGAAGATGATCCCGCTGGCTGTTGAAAAACTGCTGGACTTCGACAACACCCCTGAAAAAG  
 AACCTGCTGAACTACATCGACGAAAACAAGCTGTACCTGATCGGTAGTGCTGAATACGAA  
 AAAAGTAAAGTGAACAAATACCTGAAGACCATCATGCCGTTTCGACCTGAGTATCTACACC

AACGACACCATCCTGATCGAAATGTTCAACAAATACAACCTCT

SEQ ID 4 Secuencia de ADN de LHC

ATGACGTGGCCAGTTAAGGATTTCAACTACTCAGATCCTGTAAATGACAACGATATTCTGT  
ACCTTCGCATTCCACAAAATAAACTGATCACCACACCAGTCAAAGCATTATGATTACTCA  
AAACATTTGGGTCATTCCAGAACGCTTTTCTAGTGACACAAATCCGAGTTTATCTAAACCT  
CCGCGTCCGACGTCCAAATATCAGAGCTATTACGATCCCTCATATCTCAGTACGGACGAA  
CAAAAAGATACTTTCTTAAAGGTATCATTAACTGTTTAAGCGTATTAATGAGCGCGATA  
TCGGGAAAAGTTGATTAATTATCTTGTTGTGGGTTCCCGTTTCATGGGCGATAGCTCTA  
CCCCCGAAGACACTTTTGATTTTACCGTCCATACGACAAACATCGCGGTAGAGAAGTTTG  
AGAACGGATCGTGGAAAGTCACAAACATCATTACACCTAGCGTCTTAATTTTTGGTCCGC  
TGCCAAACATCTTAGATTATACAGCCAGCCTGACTTTGCAGGGGCAACAGTCAATCCGA  
GTTTCGAAGTTTTTGGTACCCTGAGCATTCTGAAAGTTGCCCGGAATTTCTGCTCACTT  
TTTCAGATGTCACCAGCAACCAGAGCTCAGCAGTATTAGGAAAGTCAATTTTTTGCATGG  
ACCCGGTTATTGCACTGATGCACGAAGTACGCACTCTCTGCATCAACTGTATGGGATCA  
ACATCCCCAGTGACAAACGTATTCGTCCCCAGGTGTCTGAAGGATTTTTCTCACAGGATG  
GGCCGAACGTCCAGTTCGAAGAGTTGTATACTTTCGGAGGCCTGGACGTAGAGATCATT  
CCCCAGATTGAGCGCAGTCAGCTGCGTGAGAAGGCATTGGGCCATTATAAGGATATTGC  
AAAACGCCTGAATAACATTAACAAAACGATTCCATCTTCGTGGATCTCGAATATTGATAAA  
TATAAGAAAATTTTTAGCGAGAAATATAATTTTGATAAAGATAATACAGGTAACCTTTGTGGT  
TAACATTGACAAATTTCAACTCCCTTTACAGTGATTTGACGAATGTAATGAGCGAAGTTGTG  
TATAGTTCCCAATACAACGTTAAGAATCGTACCCATTACTTCTCTCGTCACTACCTGCCGG  
TTTTCGCGAACATCCTTGACGATAATATTTACACTATTCGTGACGGCTTTAACTTGACCAA  
CAAGGGCTTCAATATTGAAAATTCAGGCCAGAACATTGAACGCAACCCGGCCTTGACAGAA  
ACTGTGAGTGAATCCGTGGTTGACCTGTTTACCAAAGTCTGCGTCGACAAAAGCGAAGA  
GAAGCTGTACGATGACGATGACAAAGATCGTTGGGGATCGTCCCTGCAGTGTATTAAGT  
GAAAAACAATCGGCTGCCTTATGTAGCAGATAAAGATAGCATTAGTCAGGAGATTTTCGA  
AAATAAAATTATCACTGACGAAACCAATGTTTACGAATTATTAGATAAATTTTCACTGGACG  
AAAGCATCTTAGATGGCCAAGTTCCGATTAACCCGGAATTGTTGATCCGTTACTGCCGA  
ACGTGAATATGGAACCGTTAAACCTCCCTGGCGAAGAGATCGTATTTTATGATGACATTA  
CGAAATATGTGGACTACCTTAATTCTTATTACTATTTGGAAAGCCAGAACTGTCCAATAA  
CGTGGAAAACATTACTCTGACCACAAGCGTGGAAGAGGCTTTAGGCTACTCAAATAAGAT  
TTATACCTTCCCTCCCGTCCGCTGGCGGAAAAAGTAAATAAAGGTGTGCAGGCTGGTCTGTT  
CCTCAACTGGGCGAATGAAGTTGTGGAAGACTTTACCACGAATATTATGAAAAAGGATAC  
CCTGGATAAAATCTCCGACGTCTCGGTTATTATCCCATATATTGGCCCTGCGTTAAATATC  
GGTAATAGTGCCTGCGGGGGAATTTTAAACCAGGCCTTTGCTACCGCGGGCGTCCGTT  
CCTCCTGGAGGGCTTTCTGAATTTACTATCCCGCGCTCGGTGTTTTTACATTTACTCT

TCCATCCAGGAGCGTGAGAAAATTATCAAAACCATCGAAAACCTGCCTGGAGCAGCGGGT  
 GAAACGCTGGAAAGATTCTTATCAATGGATGGTGTCAAACCTGGTTATCTCGCATCACGAC  
 CCAATTC AACCATATTAATTACCAGATGTATGATAGTCTGTCTGACCAAGCTGACGCCATT  
 AAAGCCAAAATTGATCTGGAATATAAAAAGTACTCTGGTAGCGATAAGGAGAACATCAAAA  
 GCCAGGTGGAGAACCTTAAGAATAGTCTGGATGTGAAAATCTCTGAAGCTATGAATAACA  
 TTAACAAATTCATTCGTGAATGTTTCGGTGACGTACCTGTTCAAGAATATGCTGCCAAAAGT  
 TATTGATGAACTGAATAAATTTGATCTGCGTACCAAACCGAACTTATCAACCTCATCGAC  
 TCCCACAACATTATCCTTGTGGGCGAAGTGGATCGTCTGAAGGCCAAAGTAAACGAGAG  
 CTTTGAAAATACGATGCCGTTTAATATTTTTTCATATACCAATAACTCCTTGCTGAAAGATA  
 TCATCAATGAATATTTCAAT

SEQ ID 5 Secuencia de ADN de LHD

ATGACGTGGCCAGTTAAGGATTTCAACTACTCAGATCCTGTAAATGACAACGATATTCTGT  
 ACCTTCGCATTCCACAAAATAAACTGATCACCACACCAGTCAAAGCATTTCATGATTACTCA  
 AACATTTGGGTCATTCCAGAACGCTTTTCTAGTGACACAAATCCGAGTTTATCTAAACCT  
 CCGCGTCCGACGTCCAAATATCAGAGCTATTACGATCCCTCATATCTCAGTACGGACGAA  
 CAAAAGATACTTTCCTTAAAGGTATCATTAACTGTTTAAGCGTATTAATGAGCGCGATA  
 TCGGGAAAAAGTTGATTAATTATCTTGTGTGGGTTCCCGTTCATGGGCGATAGCTCTA  
 CCCCCGAAGACACTTTTGATTTTACCCGTCATACGACAAACATCGCGGTAGAGAAGTTTG  
 AGAACGGATCGTGAAAAGTCACAAACATCATTACACCTAGCGTCTTAATTTTTGGTCCGC  
 TGCCAAACATCTTAGATTATACAGCCAGCCTGACTTTGCAGGGGCAACAGTCGAATCCGA  
 GTTTCGAAGGTTTTGGTACCCTGAGCATTCTGAAAGTTGCCCGGAATTTCTGCTCACTT  
 TTTTCAGATGTCACCAGCAACCAGAGCTCAGCAGTATTAGGAAAGTCAATTTTTTGCATGG  
 ACCCGGTTATTGCACTGATGCACGAACTGACGCACTCTCTGCATCAACTGTATGGGATCA  
 ACATCCCAGTGACAAACGTATTCGTCCCAGGTGTCTGAAGGATTTTTCTCACAGGATG  
 GGCCGAACGTCCAGTTCGAAGAGTTGTATACTTTCGGAGGCCTGGACGTAGAGATCATT  
 CCCCAGATTGAGCGCAGTCAGCTGCGTGAGAAGGCATTGGGCCATTATAAGGATATTGC  
 AAAACGCCTGAATAACATTAACAAAACGATTCCATCTTCGTGGATCTCGAATATTGATAAA  
 TATAAGAAAATTTTTAGCGAGAAATATAATTTTGATAAAGATAATACAGGTAACCTTTGTGGT  
 TAACATTGACAAATCAACTCCCTTTACAGTGATTTGACGAATGTAATGAGCGAAGTTGTG  
 TATAGTTCCCAATAACAACGTTAAGAATCGTACCCATTACTTCTCTCGTCACTACCTGCCGG  
 TTTTCGCGAACATCCTTGACGATAATATTTACACTATTCGTGACGGCTTTAACTTGACCAA  
 CAAGGGCTTCAATATTGAAAATTCAGGCCAGAACATTGAACGCAACCCGGCCTTGACAGAA  
 ACTGTGAGTGAATCCGTGGTTGACCTGTTTACCAAAGTCTGCGTCGACAAAAGCGAAGA  
 GAAGCTGTACGATGACGATGACAAAGATCGTTGGGGATCGTCCCTGCAGTGTATTAAGT  
 GAAAAACAATCGGCTGCCTTATGTAGCAGATAAAGATAGCATTAGTCAGGAGATTTTCGA  
 AAATAAAATTATCACTGACGAAACCAATGTTTCAGAATTATTCAGATAAATTTCACTGGACG

5

AAAGCATCTTAGATGGCCAAGTTCCGATTAACCCGGAAATTGTTGATCCGTTACTGCCGA  
ACGTGAATATGGAACCGTTAAACCTCCCTGGCGAAGAGATCGTATTTTATGATGACATTA  
CGAAATATGTGGACTACCTTAATTCTTATTACTATTTGGAAAGCCAGAACTGTCCAATAA  
CGTGAAAAACATTACTCTGACCACAAGCGTGGAAGAGGCTTTAGGCTACTCAAATAAGAT  
TTATACCTTCCCTCCCGTCGCTGGCGGAAAAAGTAAATAAAGGTGTGCAGGCTGGTCTGTT  
CCTCAACTGGGCGAATGAAGTTGTCTGAAGACTTTACCACGAATATTATGAAAAAGGATAC  
CCTGGATAAAATCTCCGACGTCTCGGTTATTATCCCATATATTGGCCCTGCGTTAAATATC  
GGTAATAGTGCCTGCGGGGGAATTTTAAACCAGGCCCTTGCTACCGCGGGCGTCCGCTT  
CCTCCTGGAGGGCTTTCCTGAATTTACTATCCCGCGCTCGGTGTTTTTACATTTTACTCT  
TCCATCCAGGAGCGTGAGAAAATTATCAAAACCATCGAAAACCTGCCTGGAGCAGCGGGT  
GAAACGCTGGAAAGATTCTTATCAATGGATGGTGTCAAACCTGGTTATCTCGCATCACGAC  
CCAATTCAACCATATTAATTACCAGATGTATGATAGTCTGTCTGACCAAGCTGACGCCATT  
AAAGCCAAAATTGATCTGGAATATAAAAAGTACTCTGGTAGCGATAAGGAGAACATCAAAA  
GCCAGGTGGAGAACCTTAAGAATAGTCTGGATGTGAAAATCTCTGAAGCTATGAATAACA  
TTAACAAATTCATTCGTGAATGTTTCGGTGACGTACCTGTTCAAGAATATGCTGCCAAAAGT  
TATTGATGAACTGAATAAATTTGATCTGCGTACCAAACCGAACTTATCAACCTCATCGAC  
TCCCACAACATTATCCTTGTGGGCGAAGTGGATCGTCTGAAGGCCAAAGTAAACGAGAG  
CTTTGAAAATACGATGCCGTTTAATATTTTTTCATATACCAATAACTCCTTGCTGAAAGATA  
TCATCAATGAATATTTCAAT

SEQ ID 6 EGFH16N  
NSDSECPLSHDGYCLNDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

5 SEQ ID 7 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v1  
NSDSECPLSHDGYCLHGGVCMYIKAVDRYACNCVVG YIGERCQYRDLTWWGPR

SEQ ID 8 EGFH16Q  
10 NSDSECPLSHDGYCLQDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 9 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v2  
SRGSKPPSHDGYCLQGGVCMYIEALDRYACNCVVG YAGERCQYRDLTWWGRR

15 SEQ ID 10 EGFW49L  
NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKLWELR

SEQ ID 11 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v3  
20 NSDPKCPLSHEGYCLNDGVCMYIGTLDRYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 12 EGFW49I  
NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKIWELR

SEQ ID 13 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v4  
25 NSYSECPPSYDGYCLHDGVCRYIEALDSYACNCVVG YAGERCQYRDLRWWGRR

SEQ ID 14 EGFW49V  
NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKVVWELR

30 SEQ ID 15 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v5



NSDSGCPSFHDGYCLNGGVCMYIEALDKYACNCVIGYNGDRCQTRDLKWWELR

SEQ ID 16 EGFW49A

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKAWELR

5

SEQ ID 17 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v6 (G12Q)

NSDSECPLSHDQYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 18 EGFW49G

10 NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKGWELR

SEQ ID 19 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v7 (H16D)

NSDSECPLSHDGYCLDDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

15 SEQ ID 20 EGFW49S

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKSWELR

SEQ ID 21 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v8 (Y13W)

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

20

SEQ ID 22 EGFW49T

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKTWELR

SEQ ID 23 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v9 (Q43A)

25 NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCAYRDLKWWELR

SEQ ID 24 EGFW49N

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKNWELR

30 SEQ ID 25 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v10 (H16A)

NSDSECPLSHDGYCLADGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 26 EGF\_W49Q

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKQWELR

35

SEQ ID 27 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v11 (L15A)

NSDSECPLSHDGYCAHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 28 EGF\_H16N\_W49L

40 NSDSECPLSHDGYCLNDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKLWELR

SEQ ID 29 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v12 (V19E)

NSDSECPLSHDGYCLHDGECMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

45 SEQ ID 30 EGF\_H16Q\_W49L

NSDSECPLSHDGYCLQDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKLWELR

SEQ ID 31 Secuencia de proteínas de un resto diana de variantes de EGF v13 (V34D)

NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

50

SEQ ID 32 EGF\_H16N\_W49I

NSDSECPLSHDGYCLNDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCYRDLKIWELR

SEQ ID 33 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv1 (activación de Xa)

55

MEFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPEEGDLNPPP  
EAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFEIYSTD LGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTEL  
KVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFT  
FGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAPNRVFKVNTNAYYEMSGLE  
VSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIAS TLNKA SIVGTTASLQYMKNVFKEKY  
LLEDTS GKFSDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFV KFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIY  
DGFNLRNTNLAANFNGQNT EINNMFNFTKLNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSIDGRNKALNL  
QCIKVNNDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI  
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGK KYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSR  
  
VYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNML  
YKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT VQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIV  
TNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINK  
AMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVK RLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKDKVNN  
TLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTLEGGGGSGGGGSGGGGSALD NSDSECPLSHDQYCLHDGV  
CMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 34 EGF\_H16Q\_W49I  
NSDSECPLSHDGYCLQDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKIWELR

5 SEQ ID 35 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv2 (activación de Xa)

MEFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPEEGDLNPPP  
EAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFEIYSTD LGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTEL  
KVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFT  
FGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAPNRVFKVNTNAYYEMSGLE  
VSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIAS TLNKA SIVGTTASLQYMKNVFKEKY  
LLEDTS GKFSDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFV KFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIY  
DGFNLRNTNLAANFNGQNT EINNMFNFTKLNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSIDGRNKALNL  
QCIKVNNDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI  
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGK KYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSR  
VYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNML  
YKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT VQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIV  
TNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINK  
AMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVK RLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKDKVNN  
TLSTDIPFQLSKYVDNQRLLSTLEGGGGSGGGGSGGGGSALD SRGSKCPPSHDGYCLQGG  
VCMYIEALDRYACNCVVG YAGERCQYRDLTWWGRR

10 SEQ ID 36 EGF\_H16N\_W50A  
NSDSECPLSHDGYCLNDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWaelr

SEQ ID 37 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv3 (mutación mejorada)

MEFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPEEGDLNPPP  
EAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFEIYSTD LGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTEL  
KVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECLSGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFT  
FGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGI AINPNRVFKVNTNAYYEMSGLE  
VSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS TLNKA SIVGTTASLQYMKNVFKEKY  
LLEDTSKGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKKFV LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIY

DGFNLRNTNLAANFNGQNT EINN MNFTKLNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKNKALN  
LQCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI  
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGK KYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSR  
VYTFSSDYVKKV NKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNML  
YKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKV LTVQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIV  
TNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINK  
AMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKDKVNN  
TLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDPKCPLSHEGYCLNDGV  
CMYIGTLDRYACNCVVG YVGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 38 EGF\_H16Q\_W50A

5 NSDSECLSHDGYCLQDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWAELR

SEQ ID 39 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv4

MEFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPEEGDLNPPP  
EAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFEIYSTD LGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTEL  
KVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFT  
FGFEESLEVDTNPLL GAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGI AINPNRVFKVNTNAYYEMSGLE  
VSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIAS TLNKA SIVGTTASLQYMKNVFKEKY  
LLEDTSKGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKKFV LNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIY  
DGFNLRNTNLAANFNGQNT EINN MNFTKLNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKNKALN  
LQCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI  
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGK KYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSR  
VYTFSSDYVKKV NKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIPYIGPALNIGNML  
YKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKV LTVQTIDNALS KRNEKWDEVYKYIV  
TNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINK  
AMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDR LKDKVNN  
TLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSYSECPPSYDGYCLHDGV  
CRYIEALDSYACNCVVG YAGERCQYRDLRWWGRR

10

SEQ ID 40 EGF\_H16N\_W49L\_W50A

NSDSECLSHDGYCLNDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 41 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv5

MEFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPEEGDLNPPP  
EAKQVPVSYDYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTEL  
KVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFT  
  
FGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAPNRVFKVNTNAYYEMSGLE  
VSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASLTNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKY  
LLEDTSKGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKKFKVLRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIY  
DGFNLRNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKKNKALN  
LQCIKVNNDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI  
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFHKGKSRIALNSVNEALLNPSR  
VYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNML  
YKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSQRNEKWDEVYKYIV  
TNWLAKVNTQIDLRKKMKEALENQAATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINK  
AMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIDNRGTLIGQVDRDKDKVNN  
TLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTLEGGGGSGGGGGSGGGGSALDNSDSCPSFHDGYCLNGG  
VCMYIEALDKYACNCVIGYNGDRCQTRDLKWWELR

5 SEQ ID 42 EGF\_H16Q\_W49L\_W50A  
NSDSECLSHDGYCLQDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 43 Secuencia de proteínas de LHA-EGFv6

MEFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWIPERDTFTNPEEGDLNPPP  
EAKQVPVSYDYDSTYLSTDNEKDNLYLKGVTCLFERIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTEL  
KVIDTNCINVIQPDGYSRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFT  
FGFEESLEVDTNPLLGAGKFATDPAVTLAHELHAGHRLYGIAPNRVFKVNTNAYYEMSGLE  
VSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASLTNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKY  
LLEDTSKGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKKFKVLRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIY  
DGFNLRNTNLAANFNGQNTNINNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVDGIITSKTKSDDDDKKNKALN  
LQCIKVNNDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLTFNFDNEPENISI  
ENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFHKGKSRIALNSVNEALLNPSR  
VYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGNML  
YKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLTVQTIDNALSQRNEKWDEVYKYIV  
TNWLAKVNTQIDLRKKMKEALENQAATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINK  
AMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIDNRGTLIGQVDRDKDKVNN  
TLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTLEGGGGSGGGGGSGGGGSALDNSDSECLSHDQYCLHDGV  
10 CMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 44 EGF\_H16N\_W49L\_W50A  
NSDSECLSHDGYCLNDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKIAELR

SEQ ID 45 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv7

MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKA FRITGNIWVIPDRFSRNSNP NLNKPPRVT  
SPKSGYYDPNYLSTDSKD TFLKEI IKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFP GNNNTPI NTDFDFDV  
DFNSVDVKTRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSII SISP  
RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILIMHELNHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQ  
YNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKL  
IRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFN YAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
VYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL SRNPALRKVN PENMMLYLF TKFCVDADDDDKLYNKT LQCR  
ELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSV DQVILSKNTSEHGQLDLLYPSID  
SESEILPGENQVFDNRTQNV DYLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFP  
TLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTL DKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFT  
EAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTW  
LSRIITQFN NISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYK KYSGSDKENIKSQVENLKN SLDVKISEAMN  
NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHN IILVGEVDK LKAKVNNSFQNTI  
PFNIFSYTNN SLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHDGYCLDDGVC  
MYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

5 SEQ ID 46 EGF\_H16Q\_W49L\_W50A  
NSDSECPLSHDGYCLQDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKIAELR

SEQ ID 47 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv8

MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKA FRITGNIWVIPDRFSRNSNP NLNKPPRVT  
SPKSGYYDPNYLSTDSKD TFLKEI IKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFP GNNNTPI NTDFDFDV  
DFNSVDVKTRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSII SISP  
RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILIMHELNHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQ  
YNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKL  
IRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFN YAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
VYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL SRNPALRKVN PENMMLYLF TKFCVDADDDDKLYNKT LQCR  
ELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSV DQVILSKNTSEHGQLDLLYPSID  
SESEILPGENQVFDNRTQNV DYLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFP  
TLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTL DKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFT  
EAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTW  
LSRIITQFN NISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYK KYSGSDKENIKSQVENLKN SLDVKISEAMN  
NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHN IILVGEVDK LKAKVNNSFQNTI  
PFNIFSYTNN SLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHDGYCLDDGVC  
MYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

10

SEQ ID 48 EGF\_H16N\_W49L\_W50A\_E24G  
NSDSECPLSHDGYCLNDGVCMYIGALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 49 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv9

MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKA FRITGNIWVIPDRFSRNSNP NLNKPPRVT  
SPKSGYYDPNYLSTDSKD TFLKEI IKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFP GNNNTPI NTFDFDV  
DFNSVDVKTRQGN NWVKTGSINPSVIITGP RENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSII SISP  
RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHEL NHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFY SQ  
YNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKL  
IRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFN YAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
VYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL SRNPALRKVN PENMLYLFTKFCVDADDDDKLYNKT LQCR  
ELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSV DQVILSKNTSEHGQLDLLYPSID  
SESEILPGENQVFYDNRTQNV DYLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFP  
TLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTL DKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFT  
EFAVTVGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTW  
LSRIITQFN NISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMN  
NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHN IILVGEVDK LKAKVNNSFQNTI  
PFNIFSYTNN SLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHDGYCLHDGVC  
MYIEALDKYACNCVVG YIGERCAYRDLKWWELR

5 SEQ ID 50 EGF\_H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25T  
NSDSECPLSHDGYCLNDGVCMYIGTLDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 51 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv10

MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKA FRITGNIWVIPDRFSRNSNP NLNKPPRVT  
SPKSGYYDPNYLSTDSKD TFLKEI IKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFP GNNNTPI NTFDFDV  
DFNSVDVKTRQGN NWVKTGSINPSVIITGP RENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSII SISP  
RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHEL NHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFY SQ  
YNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKL  
IRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFN YAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
VYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL SRNPALRKVN PENMLYLFTKFCVDADDDDKLYNKT LQCR  
ELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSV DQVILSKNTSEHGQLDLLYPSID  
SESEILPGENQVFYDNRTQNV DYLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFP  
TLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTL DKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFT  
EFAVTVGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTW  
LSRIITQFN NISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMN  
NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHN IILVGEVDK LKAKVNNSFQNTI  
PFNIFSYTNN SLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHDGYCLADGVC  
MYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

10

SEQ ID 52 EGF\_H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25S  
NSDSECPLSHDGYCLNDGVCMIYIGSLDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

5 SEQ ID 47 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv11

MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNP NLNKPPRVT  
SPKSGYYDPNYLSTDSKD TFLKEI IKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNTPI NTFDFDV  
DFNSVDVKTRQGNNWVK TGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSII SISP  
RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILIMHELNHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQ  
YNVKLEYAEIYAFGGPTID LIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIG EYKQKL  
IRKYRFVVESSGEVTVNR NKFVELYNELTQIFTEFN YAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
VYDIQNGFNIPKSNLNVLF MGQNLSRNPALRKVNPENMLYLFTKFCVDADDDDKLYNKT LQCR  
ELLVKNTDLPFIGDISDV KTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSV DQVILSKNTSEHGQLDLLYPSID  
SESEILPGENQVFYDNRT QNV DYLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFP  
TLANKVNAGVQGGFLMW ANDVVEDFTTNILRKDTL DKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFT  
EFAVTVGVTILLEAFPEFT IPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTW  
LSRIITQFN NISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKN SLDVKISEAMN  
NINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHN IILVGEVDK LKAKVNNSFQNTI  
PFNIFSYTNNSLLKDIINE YFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHDGYCAHDGVC  
MYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 54 EGF\_H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25T\_K28R  
NSDSECPLSHDGYCLNDGVCMIYIGTLDRYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

10 SEQ ID 55 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv12

MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNP NLNKPPRVT  
SPKSGYYDPNYLSTDSKD TFLKEI IKLFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNTPI NTFDFDV  
DFNSVDVKTRQGNNWVK TGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSII SISP  
RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILIMHELNHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQ  
YNVKLEYAEIYAFGGPTID LIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIG EYKQKL  
IRKYRFVVESSGEVTVNR NKFVELYNELTQIFTEFN YAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
VYDIQNGFNIPKSNLNVLF MGQNLSRNPALRKVNPENMLYLFTKFCVDADDDDKLYNKT LQCR  
ELLVKNTDLPFIGDISDV KTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSV DQVILSKNTSEHGQLDLLYPSID  
SESEILPGENQVFYDNRT QNV DYLNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFP  
TLANKVNAGVQGGFLMW ANDVVEDFTTNILRKDTL DKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFT  
EFAVTVGVTILLEAFPEFT IPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTW  
  
LSRIITQFN NISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKN SLDVKISEAMN  
NINKFIRECSVTYLFKNM LPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHN IILVGEVDK LKAKVNNSFQNTI  
PFNIFSYTNNSLLKDIINE YFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHDGYCLHDGEC  
MYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 56 EGF\_H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25T\_K28R\_S4P  
NSDPECPLSHDGYCLNDGVCMYIGTLDRYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

5 SEQ ID 57 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv13

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNKPPRVT  
SPKSGYYDPNYLSTDSKDFTLKEIILFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNTPIINTDFDFV  
DFNSVDVKTRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSIIISIP  
RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILMHENHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQ  
YNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYYSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKL  
IRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNKYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
VYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL SRNPALRKVNPENMLYLFTKFCVDADDDDKLYNKTLOCR  
ELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSVQVILSKNTSEHGQLDLLYPSID  
SESEILPGENQVFYDNRTQNVVDYLSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFP  
TLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLKDSDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFT  
EAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTW  
LSRIITQFNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMN  
NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNII LVGEVDKLLKAKVNN SFQNTI  
PFNIFSYTNN SLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHDGYCLHDGVC  
MYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 58 EGF\_H16N\_W49L\_W50A\_E24G\_A25T\_K28R\_S4P\_E5K  
10 NSDPKCPLSHDGYCLNDGVCMYIGTLDRYACNCVVG YIGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 59 Secuencia de proteínas de LHB-EGFv1



MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNKSSGI  
FNRDVCEYYDPDYLTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLGDRRVPLEEFN  
TNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFASREGFGGIMQMKF  
CPEYVSFVFNQENKASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVLHGLYGIKVDDLPIVPNEKKFFMQ  
STDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFGRGIVDRLNKVLCISDPNININIKNFKD  
KYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEI  
YTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKEHLAVYKIQMCVDEEKLYDDDDKDRWGS  
SLQCIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNERIEYNTQSNYIENDFPINELILDTLISKIELPSENTE

SLTDFNVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQTFPLDIRDISLTSSFDALLFSNKVYSFFSM  
DYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTMDAIADISLIVPYIGLALNVGNETAAGNFE  
NAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLESYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSDMYGLIVAQWLST  
VNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNENINQAINNINNF  
INGCSVSYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVNKYLKTIMPFDL  
SIYTNDTILIEFMFNKYSLEGGGGSGGGGSGGGGSALDSRGSKCPPSHDGYCLQGGVCMYI  
EALDRYACNCVVGYAGERCQYRDLTWWGRR

SEQ ID 60 EGFv3

NSDPKCPLSHEGYCLNDGVCMIYIGTLDRYACNCVVGYGERCQYRDLKLAELR

5

SEQ ID 61 Secuencia de proteínas de LHB-EGFv5

MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRIYKAFKITDRIWIIPERYTFGYKPEDFNKSSGI  
FNRDVCEYYDPDYLTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKSKPLGEKLEMIINGIPYLGDRRVPLEEFN  
TNIASVTVNKLISNPGEVERKKGIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFASREGFGGIMQMKF  
CPEYVSFVFNQENKASIFNRRGYFSDPALILMHელიHVLHGLYGIKVDDLPIVPNEKKFFMQ  
STDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFGRGIVDRLNKVLCISDPNININIKNFKD  
KYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEI  
YTIEEGFNISDKDMEKEYRGQNKAINKQAYEEISKEHLAVYKIQMCVDEEKLYDDDDKDRWGS  
SLQCIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKNERIEYNTQSNYIENDFPINELILDTLISKIELPSENTE  
SLTDFNVDVPVYEKQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQTFPLDIRDISLTSSFDALLFSNKVYSFFSM  
DYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVNDFVIEANKSNTMDAIADISLIVPYIGLALNVGNETAAGNFE  
NAFEIAGASILLEFIPELLIPVVGAFLESYIDNKNKIIKTIDNALTKRNEKWSDMYGLIVAQWLST  
VNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIIKYRYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLNENINQAINNINNF  
INGCSVSYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVNKYLKTIMPFDL  
SIYTNDTILIEFMFNKYSLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSGCPHFHDGYCLNGGVCMYI  
EALDKYACNCVIGYNGDRCQTRDLKWWELR

10 SEQ ID 62 Secuencia de proteínas del tétanos LHN-EGFv1

MPITINNFVSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKPEDFNPPSSLI  
EGASEYYDPNYLRTDSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNSYSLLDKFDT  
NSNSVSNLLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNNEVRGIVLRVDNKNYFPCRDGFGSI  
MQMAFCPEYVPTFDNVIENITSLTIGKSKYFQDPALLMHLELHVHGLYGMQVSSHEIIPSKQE  
IYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKTLDYKAIANKLSQVTSNDPNIDIDSYKQ  
IYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYGFTIEELGKKFNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLL  
DDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKQNMVNTNAFRNVDGSGLVSKLIGLCVDGIITSKTKSDDD  
DKNKALNLQCIKIKNEDLTFIAEKNSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITL  
  
PNDRTTPVTKGIPYAPEYKSNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINST  
KIYSYFPSVISKVNQGAQGILFLQWVRDIIDDFTNESQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQG  
YEGNFIGALETTGVVLLLEIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIIKTIDNFLEKRYEKWIEVYKLVKA  
KWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKIIDYEQYKISGPDKEQIADEINNLKNKLEEKANK  
AMININIFMRESSRSLVNQMINEAKKQLEFDTQSKNLMQYIKANSKFIGITELKKLESKINKV  
FSTPIPFYSYKNLDCWVDNEEDIDVGLGEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHDQYCL  
HDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

SEQ ID 63 Secuencia de proteínas de LHD-EGFv6 (sitio sensible a proteasa)

MTWPVKDFNYSVNDNDILYLRIPQNKLITTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNPSLSKPPRP  
TSKYQSYDPSYLSTDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYLTVGSPFMGDSSTPEDTFDF  
TRHTTNIAVEKEFENGSWKVVTNIITPSVLIFGPLNILDYASLTLQGQQSNPSFEGFGTSLKLV  
APEFLLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFCMDPVIALMHETHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFSS  
LDGRNVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDIKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKI  
FSEKYNFDKDNFTGNFVNIDKFNLSYDLTNVMSEVVYSSQYVKNRTHYFSRHYLPVFANIL  
DDNIYTIRDGFNLTKGFNIENSGQNIERNPALQKLSSESVVDLFTKVCVDKSEEKLYDDDDKD  
RWGSSLQCIKVKNNRPLPYVADKDSISQEIFENKIITDETNVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEI  
VDPLLPNVMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLSYYSQKLSNNVENITLTSVEEALGYS  
NKIYTFPLSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEEVDFTTNIMKKDTLTKISDVSVIPIYIGPALNIGNS  
ALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSIQEREKIIKTIENCLEQRVKRWKDSY  
QWMVSNWLSRITTFNHINYQMYDSLQYQADAIKAKIDLEYKYSYSGSDKENIKSQVENLKNL  
DVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRKTTELINLIDSHNIIIVGEVDRLKAK  
VNESFENTMPFNIFSNTNSLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSECPLSHD  
QYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELR

5

SEQ ID 64 Secuencia de proteínas de LHD-EGFv3

MTWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRIPQNKLITTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNP SLSKPPRP  
 TSKYQSYYDPSYLS TDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFD  
 TRHTTNI AVEKFENG SWKVTNIITPSVLIFGPLNILDYASLTLQGQQSNPSFEGFGTLSILKV  
 APEFLLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFC MDPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFFS  
 LDGRNVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKI  
 FSEKYNFDKDNTGNFVFNIDKFNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANIL  
 DDNIYTIRDGFNL TNKGFNIENSGQNIERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEEKLYDDDDKD  
 RWGSSLQC IKVKNNRLPYVADKDSISQEIFENKIITDET NVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEI  
 VDPLLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYS  
 NKIYTFLPSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL DKISDVSVIIPYIGPALNIGNS  
 ALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSI QEREKIIKTIENCLEQRVKRWKDSY

QWMVSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSL  
 DVKISEAMNNINK FIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTK TELINLIDSHN IILVGEVDRLKAK  
 VNESFENTMPFNIFSYTNN SLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALD NSDPKCPLSHE  
 GYCLNDGVCMYIGTLDRYACNCVVG YVGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 65 Secuencia de proteínas de LHD-EGFv11

MTWPVKDFNYS DPVNDNDILYLRIPQNKLITTPVKAFMITQNIWVIPERFSSDTNP SLSKPPRP  
 TSKYQSYYDPSYLS TDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIGKKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTDFD  
 TRHTTNI AVEKFENG SWKVTNIITPSVLIFGPLNILDYASLTLQGQQSNPSFEGFGTLSILKV  
 APEFLLTFSDVTSNQSSAVLGKSIFC MDPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFFS  
 QDGPNVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNNINKTIPSSWISNIDKYKKI  
 FSEKYNFDKDNTGNFVFNIDKFNSLYSDLTNVMSEVVYSSQYNVKNRTHYFSRHYPVFANIL  
 DDNIYTIRDGFNL TNKGFNIENSGQNIERNPALQKLSSESVDLFTKVCVDKSEEKLYDDDDKD  
 RWGSSLQC IKVKNNRLPYVADKDSISQEIFENKIITDET NVQNYSDKFSLDESILDGQVPINPEI  
 VDPLLPNVNMEPLNLPGEEIVFYDDITKYVDYLN SYYLESQKLSNNVENITLTSVEEALGYS  
 NKIYTFLPSLAEKVNKGVQAGLFLNWANEVVEDFTTNIMKKDTL DKISDVSVIIPYIGPALNIGNS  
 ALRGNFNQAFATAGVAFLEGFPEFTIPALGVFTFYSSI QEREKIIKTIENCLEQRVKRWKDSY  
 QWMVSNWLSRIT TQFNHINYQMYDSL SYQADAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSL  
 DVKISEAMNNINK FIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNKFDLRTK TELINLIDSHN IILVGEVDRLKAK  
 VNESFENTMPFNIFSYTNN SLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALD NSDSECP LSHD  
 GYCLDDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

5

SEQ ID 66 Secuencia de proteínas de M26- IgA1- HC- EGFv3

MESNQPEKNGTATKPENSGNTTSENGQTEPEKKLELRNVSDIELYSQTNGTYRQHVS LDGIP  
ENTDTYFVKVKSSAFKDVYIPVASITEEKRNQSVYKITAKAEKLQQUELENKYVDNFTFYLDKK  
AKEENTNFTSFSNLVKAINQNPSGTYHLAASLNANEVELGPDERSYIKDTFTGRLIGEKDGKN  
YAIYNLKKPLFENLSGATVEKLSLKNVAISGKNDIGSLANEATNGTKIKQVHVDGCVDEEKLYD  
DDDKDRWGSSLQCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSVDQVILSKN  
TSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVDYLNSSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIE  
EALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGLFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIG  
PALNISNSVRRGNFTEAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIKR  
WKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVE  
NLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIIIVGEV  
DKLKAKVNNSFQNTIPFNIFS YTNNSLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDPKC  
PLSHEGYCLNDGVCMYIGTLDRYACNCVVG YVGERCQYRDLKLAELR

SEQ ID 67 Secuencia de proteínas de M26- IgA1- HC- EGFv11

MESNQPEKNGTATKPENSGNTTSENGQTEPEKKLELRNVSDIELYSQTNGTYRQHVS LDGIP  
ENTDTYFVKVKSSAFKDVYIPVASITEEKRNQSVYKITAKAEKLQQUELENKYVDNFTFYLDKK  
AKEENTNFTSFSNLVKAINQNPSGTYHLAASLNANEVELGPDERSYIKDTFTGRLIGEKDGKN  
YAIYNLKKPLFENLSGATVEKLSLKNVAISGKNDIGSLANEATNGTKIKQVHVDGCVDEEKLYD  
DDDKDRWGSSLQCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSVDQVILSKN  
TSEHGQLDLLYPSIDSESEILPGENQVFYDNRTQNVDYLNSSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIE  
EALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQGGLFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIG  
PALNISNSVRRGNFTEAFVAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIKR  
WKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVE  
NLKNSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIIIVGEV  
DKLKAKVNNSFQNTIPFNIFS YTNNSLLKDIINEYFNLEGGGGSGGGGSGGGGSALDNSDSEC  
PLSHDGYCAHDGVCMYIEALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELR

5

SEQ ID 68 Secuencia de proteínas del tétanos LHN-EGFv3

MPITINNFYSDPVNNDTIIMMEPPYCKGLDIYYKAFKITDRIWIVPERYEFGTKEPEDFNPPSSLI  
 EGASEYYDPNYLRTSDKDRFLQTMVKLFNRIKNNVAGEALLDKIINAIPYLGNSYSLLDKFDT  
 NSNSVSFNLEQDPSGATTKSAMLTNLIIFGPGPVLNKNEVRGIVLRVDNKNYFPCRDGFGSI  
 MQMAFCPEYVPTFDNVIENTISLTIGKSKYFQDPALLMHელიHVLHGLYGMQVSSHEIIPSKQE  
 IYMQHTYPISAEELFTFGGQDANLISIDIKNDLYEKTLDYKAIANKLSQVTSCNDPNIDIDSYKQ  
 IYQQKYQFDKDSNGQYIVNEDKFQILYNSIMYGFTIEELGKKFNIKTRLSYFSMNHDPVKIPNLL  
 DDTIYNDTEGFNIESKDLKSEYKQNMVNTNAFRNVDSGLVSKLIGLVCVDGIITSKTKSDDD  
 DKNKALNLQCIKIKNEDLTFIAEKNSFSEEPFQDEIVSYNTKNKPLNFNYSLDKIIVDYNLQSKITL  
 PNDRTTPVTKGIPYAPEYKSNAASTIEIHNIDDNTIYQYLYAQKSPTTLQRITMTNSVDDALINST  
 KIYSYFPSVISKVNQGAQGILFLQWVRDIIDFTNESSQKTTIDKISDVSTIVPYIGPALNIVKQG  
 YEGNFIGALETTGVVLLLEYIPEITLPVIAALSIAESSTQKEKIKTIDNFLEKRYEKWIEVYKLVKA  
 KWLGTVNTQFQKRSYQMYRSLEYQVDAIKKIIDYEQYKISGPDKEQIADEINNKNKLEEKANK  
 AMININIFMRESSRSFLVNQMINEAKKQLEFDTQSKNLMQYIKANSKFIGITELKKLESKINKV  
 FSTPIPFYSYKNLDCWVDNEEDIDVGLGGGGGGGGGGSSALDNSDPKCPLSHEGYCL  
 NDGVCMYIGTLDRYACNCVVGYYGVCRCQYRDLKLAELR

SEQ ID 69 Secuencia de proteínas de LHA-CP-EGFv2

MEFVNKQFNYKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWVPERDFTFNPEEGDLNPPP  
 EAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNLYKGVTKLFEIYSTDLGRMLLSIVRGIPFWGGSTIDTEL  
 KVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFT  
 FGFEESLEVDTNPLLGAQKFDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAPNPRVFKVNTNAYYEMSGLE  
 VSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIVGTASLQYMKNVFKEY  
 5 LLEDTSKGFSDKLFKDFKLYKMLTEIYTEDNFVKKFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIY  
 DGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVDGGGGGGGGGGSSA  
 DDDDKSRGSKCPPSHDGYCLOGGVCMYIEALDRYACNCVVGYYAGERCQYRDLTWWGRRP  
 LAGGGGGGGGGGGSSALVLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEEN  
 ISLDLIQYYLTFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKEYLDKYTMFHYLRAQEF  
 EHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFDETSEV  
 STTDKIADITIIPIYIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYANKVLT  
 VQTIDNALSQRNEKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKMKKEALENQAATKAIINYQYNQYT  
 EEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALL  
 KYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLSTLEALASG

SEQ ID 70 Secuencia de proteínas de LHD-EGFv2

MEFVNKQFNKDPVNGVDIAYIKIPNAGQMOPVKAFKIHNKIWWVIPERDTFTNPEEGDLNPPP  
 EAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFEIYSTDLGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTEL  
 KVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNLVIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFT  
 FGFEESLEVDTNPLLGGAGKFDPAVTLAHELHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEMSGLE  
 VSFEELRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYYNKFKDIASLTNKAKSIVGTTASLQYMKNVFKEKY  
 LLESDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIY  
 DGFNLRNTNLAANFNGQNTTEINNMNFTKLNFTGLFEFYKLLCVDGGGGSADDDDKSRGSK  
 CPPSHDGYCLQGGVCMYIEALDRYACNCVVGYAGERCQYRDLTWWGRRALAGGGGSSGGG  
 GSGGGGSALVLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLIQQYYLT  
 FNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIERFPNGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEHGKSRIALTN  
 SVNEALLNPSRVYTFSSDYVKKVNKATEAAMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIIP  
 YIGPALNIGNMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYANKVLTVQTDNALSQRN  
 EKWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQAEATKAIINYQYNQYTEEEKNNINFNID  
 DLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIG  
 QVDRLKDKVNNTLSTDIPFQLSKYVDNQRLLS

SEQ ID 71 Secuencia de proteínas de LHC-CP-EGFv2

MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNPNLNKPPRVT  
 SPKSGYYDPNYLSTDSKDTFLKEIILFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPNNNTPIINTDFDFV  
 DFNSVDVKTRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSIIISIP  
 RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILIMHELNHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQ  
 YNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYYSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKL  
 IRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNKYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
 VYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNLNRNPALRKVNPNENMLYLFKFCVDADDDDKSRGSKCPP  
 SHDGYCLQGGVCMYIEALDRYACNCVVGYAGERCQYRDLTWWGRRALAGGGGSALALQ  
 CRELLVKNLTLDFIGDISDVKTDFLRLKINEETEVIYYPDNVSVQVILSKNTSEHGQLDLLYPS  
 IDSESEILPGENQVFYDNRTQNVLYNSYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYF  
 PTLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGN  
 FTEAFAVTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGT  
 WLSRIITQFNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLNKNSLDVKISEAM  
 NNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNIIIVGEVDKLGKAKVNNSFQN  
 TIPFNIFSNTNSLLKDIINEYF

5

SEQ ID 72 Secuencia de proteínas de LHC-EGFv3

MPITINNFNYS DPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKAFRITGNIWVIPDRFSRNSNP NLNKPPRVT  
SPKSGYYDPNYLSTDSKDFTLKEIILFKRINSREIGEELIYRLSTDIPFPGNNNTPIINTDFDV  
DFNSVDVKTRQGNWVKTGSINPSVIITGPRENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSIIISP  
RFMLTYSNATNDVGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFYSQ  
YNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYRSIAKRLNSITTANPSSFNKYIGEYKQKL  
IRKYRFVVESSGEVTVNRNKFVELYNELTQIFTEFNKYIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDN  
VYDIQNGFNIPKSNLNVLFMGQNL SRNPALRKVNPENMLYLFTKFCVDADDDDKNSDPKCPL  
SHEGYCLNDGVCMYIGTLDRYACNCVVG YVGERCQYRDLKLAELRAALAGGGGSALALQCR  
ELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNVSDVQVILSKNTSEHGQLDLLYPSID  
SESEILPGENQVFYDNRTQNVDYLN SYYYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFP  
TLANKVNAGVQGGFLMWANDVVEDFTTNILRKDTL DKISDVSAIIPYIGPALNISNSVRRGNFT  
EFAVTVGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEI IKTIDNCLEQRIKRWKDSYEWMMGTW  
LSRIITQFNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYKKYSGSDKENIKSQVENLKNSLDVKISEAMN  
NINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDELNEFD RNTKAKLINLIDSHNIILVGEVDK LKAKVNNSFQNTI  
PFNIFSYTNNSLLKDIINEYF

SEQ ID 73 Secuencia de ADN de un resto diana de variantes de EGF v3

AATAGTGACCCAAAGTGTCCATTAAGCCATGAAGGATATTGTCTAAACGATGGTGTGGTGTGTA  
TGTACATAGGGACATTGGATAGGTATGCTTGCAATTGCGTAGTGGGATACGTAGGTGAAC  
GATGCCAATATAGAGACTTAAACTGGCAGAGCTTAGA

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido, que comprende:
- 5 a. una proteasa no citotóxica que es capaz de escindir una proteína SNARE;
- b. un péptido de translocación que es capaz de translocar dicha proteasa no citotóxica de dentro de un endosoma de una célula mamífera, a través de la membrana endosomal de la misma y en el citosol de la célula mamífera; y
- 10 c. una muteína del factor del crecimiento epidérmico (EGF), en el que dicha muteína del EGF comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos el 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 11 y en el que dicha muteína del EGF retiene la afinidad de unión de SEQ ID NO: 11 para unirse a un receptor del EGF.
- 15 2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende una secuencia aminoacídica que tiene al menos el 80% o al menos el 90% o al menos el 95% de identidad de secuencia con respecto a una secuencia aminoacídica seleccionada entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 37, 64, 66 y 68.
- 20 3. Un polipéptido de acuerdo cualquier reivindicación anterior, en el que la proteasa no citotóxica comprende una proteasa de la neurotoxina clostridial o una proteasa de IgA neisseriana.
4. Un polipéptido de acuerdo cualquier reivindicación anterior, en el que el péptido de translocación comprende un dominio de translocación de la neurotoxina clostridial.
- 25 5. Un polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido está presente como un polipéptido bicatenario, en el que la proteasa no citotóxica está unida al péptido de translocación por un enlace disulfuro.
- 30 6. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.
7. Un procedimiento para preparar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende expresar un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6 en una célula huésped, preferiblemente en una célula huésped de *E. coli*.
- 35 8. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la supresión de una inflamación.
- 40 9. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la supresión de la hipersecreción de mucus y/o afecciones o enfermedades relacionadas con la hipersecreción de mucus en un paciente.
10. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la supresión de una neoplasia endocrina y/o trastornos neuroendocrinos, tales como enfermedad de Cushing y acromegalia.
- 45 11. Un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la supresión de tumores neuroendocrinos, y/o para su uso en la supresión de cáncer colorectal, cáncer de próstata, cáncer de mama, o cáncer de pulmón.
- 50



Fig. 1



