

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 465**

51 Int. Cl.:

C07K 14/245 (2006.01)

C12Q 1/18 (2006.01)

C40B 30/04 (2006.01)

C40B 40/10 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2006 E 06790746 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 1945660**

54 Título: **Biblioteca a partir de toxinas mutantes y procesos de utilización de la misma**

30 Prioridad:

26.09.2005 US 720924 P

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

11.09.2014

73 Titular/es:

**MOLECULAR TEMPLATES, INC. (100.0%)
111 W. COOPERATIVE WAY, SUITE 201
GEORGETOWN, TX 78626, US**

72 Inventor/es:

**GARIEPY, JEAN y
REVERS, LEIGH**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 493 465 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

Biblioteca a partir de toxinas mutantes y procesos de utilización de la misma

5 Antecedentes de la invención

[0001] La presente solicitud se refiere a bibliotecas de mutantes de toxinas, y a procedimientos de uso de las mismas en el desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos contra tipos de células específicas.

10 **[0002]** Las toxinas vegetales y bacterianas tienen una organización estructural con dos o más dominios o subunidades de polipéptidos responsables de distintas funciones, referidas como A y B. Las toxinas pueden referirse como toxinas AB_x, donde x representa el número de subunidades B idénticas u homólogas en la toxina. Esta familia de toxinas relacionadas con la estructura incluye ejemplos, tales como Shiga y toxinas similares a Shiga, las enterotoxinas termolábiles de *E. coli*, la toxina del cólera, la toxina de la difteria, la toxina pertussis, la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (Olsnes, S. y Sandvik, K. (1988) en *Inmunotoxins* pág. 39-73, Kluwer Academic, Boston; Sandvik, K., Dubinina, E., Garred, O., et al. (1992) *Biochem. Soc. Trans.* 20:724), así como toxinas vegetales, tales como ricina y abrina. En algunos casos las toxinas son heterómeras, en las que las cadenas B son en realidad entidades separadas que se conectan a la cadena A de la toxina a través de una unión no covalente. En otros casos, la toxina es monomérica, puesto que la cadena B forma parte de la misma proteína cuando la toxina se produce en la naturaleza. En muchos casos, la cadena A se ha caracterizado por tener dos dominios, un dominio de A1 y un dominio A2.

25 **[0003]** En base a su capacidad de bloquear la síntesis de proteínas, las proteínas, tales como toxinas de Shiga y toxinas similares a Shiga, así como ricina, abrina, gelonina, crotina, proteína antiviral de fitolaca, saporina, momordina, modicina, sarcina, toxina de la difteria y exotoxina A se han referido como proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP). La potencia de las RIP es extremadamente alta; una molécula de la cadena A de la toxina de la difteria (Yamaizumi, et al. (1978) *Cell* 15:245-250) o la cadena A de ricina (Eiklid, et al. 1980) *Exp. Cell. Res* 126:321-326) se ha demostrado que es suficiente para matar una célula eucariota.

30 **[0004]** La publicación de patente internacional N° WO99/40185 describe bibliotecas de toxinas mutantes en las que las mutaciones se introducen en el dominio de unión para alterar el tipo de células a las que se liberan las especies tóxicas. Las nuevas proteínas se derivatizan mutando una subunidad de unión de la proteína citotóxica de la proteína heterómera de tipo salvaje para crear una biblioteca de clones de microorganismos que producen proteínas mutantes, que a continuación se criban para detectar la capacidad de unirse específicamente y matar un tipo de célula diana.

35 **[0005]** La patente de EE.UU. N 5.552.144 da a conocer una variante de toxina II de tipo Shigella variante a la que se introduce una mutación en la cadena A en la posición 167 para cambiar el aminoácido en esta posición por uno con una carga diferente. Esto dio como resultado una toxina con menos actividad enzimática asociada con la toxicidad.

40 **[0006]** La patente de EE.UU. N° 6.593.132 describe proteínas tóxicas recombinantes que son específicamente tóxicas para células enfermas, pero no dependen para su especificidad de acción de un componente específico de unión a células. Las proteínas recombinantes de la patente '132 tienen una cadena A de una toxina de tipo ricina unida a una cadena B mediante una secuencia enlazadora sintética que puede ser escindida específicamente por una proteasa localizada en las células o tejidos afectados por una enfermedad específica para liberar la cadena A tóxica, inhibiendo o destruyendo así de manera selectiva las células o tejidos enfermos.

45 **[0007]** La patente de EE.UU. N° 6.649.742 da a conocer proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) de tipo I y análogos de las RIP que tienen una cisteína disponible para la unión disulfuro a moléculas diana. Las RIP y análogos de RIP se utilizan como componentes de agentes terapéuticos citotóxicos para eliminar selectivamente cualquier tipo de célula a la que el componente RIP está dirigido por la capacidad de unión específica del segundo componente del agente.

50 **[0008]** La solicitud PCT PCT/CA2004/000433 de los presentes inventores da a conocer bibliotecas combinatorias de proteínas que comprenden una pluralidad de especies de proteínas, en las que cada especie de proteína comprende una cadena A de una proteína tóxica heterómera, en la que se ha introducido un inserto.

55 **[0009]** Bray et al. *Current biology*, vol. 11(9) 1 Mayo 2011, páginas 697-701, describe el sondeo de la superficie de células eucariotas utilizando las bibliotecas combinatorias de toxinas.

60 **[0010]** Perampalan et al., *Molecular and Cellular Proteomics*, Vol. 2(9), 11 enero 2003, página 868, describe el diseño de bibliotecas combinatorias de proteínas en base a una plantilla de toxinas de proteínas.

65 **[0011]** Lacy et al. *current Opinion in Structural Biology*, Vol 8(6), Dic. 1998, páginas 778-784, describe la resolución de la estructuras y modos de acción de toxinas bacterianas.

5 [0012] Un aspecto de la presente invención es una biblioteca combinatoria de proteínas tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una pluralidad de especies de proteínas, comprendiendo cada especie de proteína una cadena A de una proteína de toxina 1 del tipo Shiga en la que se ha introducido un inserto, en la que, (a) el inserto es un polipéptido de una secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 3-200 residuos de aminoácidos; y (b) el inserto se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. En una realización adicional, la biblioteca puede comprender hasta o más de 100 especies de proteínas. El inserto se introduce en la cadena IA de la toxina de tipo Shiga entre los aminoácidos 242 y 261, tal como entre los aminoácidos 245 y 246.

10 [0013] En una realización adicional de la presente invención, el inserto tiene una longitud de 7 aminoácidos.

15 [0014] Otro aspecto de la presente invención es una proteína mutante tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una cadena A de una proteína de toxina 1 del tipo Shiga en la que se ha introducido un inserto, en el que el inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 3-200 residuos de aminoácidos; y el inserto se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. El inserto se introduce entre los aminoácidos 242 y 261, tales como entre los aminoácidos 245 y 246.

20 [0015] Un aspecto adicional descrito en el presente documento es un procedimiento para identificar un ligando que se une a una diana/receptor específico, que comprende las etapas de exponer las células que se sabe que poseen la diana/receptor a los miembros de una biblioteca combinatoria de proteínas tal como se describe en el presente documento; seleccionar los miembros de la biblioteca de proteínas que se observa que son tóxicos para las células; evaluar los miembros seleccionados de la biblioteca de proteínas para determinar la secuencia de la región insertada, mediante lo cual se identifica un péptido de la secuencia de la región insertada como un posible ligando para una diana/receptor en la célula; y adicionalmente probar péptidos de la secuencia de la región insertada para confirmar que son un ligando para la diana/receptor específico.

25 [0016] Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento, tal como se define en las reivindicaciones, para aislar una toxina específica para una diana/receptor conocido que comprende las etapas de: exponer la diana/receptor a una biblioteca combinatoria de proteínas tal como se define en las reivindicaciones; y aislar al menos una especie de proteína de la biblioteca combinatoria de proteínas capturada mediante la unión a la diana/receptor.

30 [0017] Un aspecto adicional de la presente invención es una biblioteca combinatoria de proteínas, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una pluralidad de especies de proteínas, comprendiendo cada especie de proteína una cadena A modificada de una proteína de toxina 1 del tipo Shiga en la que se ha introducido un inserto, en el que la cadena A modificada comprende una cadena A de tipo salvaje que contiene una mutación en al menos una cisteína (tal como se define en las reivindicaciones); el inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 2-300 residuos de aminoácidos; y el inserto se introduce en la región que sería un bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A de tipo salvaje.

35 [0018] Un aspecto adicional de la presente invención es una proteína mutante, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una cadena A modificada de una proteína de toxina 1 del tipo Shiga en la que se ha introducido un inserto, en el que la cadena A modificada comprende una cadena A de tipo salvaje que contiene una mutación en al menos una cisteína (tal como se define en las reivindicaciones); el inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 2-300 residuos de aminoácidos; y el inserto se introduce en la región que sería un bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A de tipo salvaje. En una realización adicional, la cadena A modificada comprende además un marcador unido a una cisteína.

40 [0019] La memoria proporciona un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en la secuencia de polipéptido que aparece en las figuras 11C, 11D, 12A, 12B, 12C, 12D.

45 [0020] La memoria proporciona un procedimiento para identificar un ligando que se une a una diana/receptor específico, que comprende las etapas de: exponer las células que se sabe que poseen la diana/receptor a los miembros de una biblioteca combinatoria de proteínas tal como se describe en el presente documento; seleccionar los miembros de la biblioteca de proteínas que se observa que son tóxicos para las células; evaluar los miembros seleccionados de la biblioteca de proteínas para determinar la secuencia de la región insertada, mediante lo cual se identifica un péptido de la secuencia de la región insertada como un posible ligando para una diana/receptor en la célula; y adicionalmente probar más péptidos de la secuencia de la región insertada para confirmar que son un ligando para la diana/receptor específico.

50 [0021] Otra realización de la presente invención es un procedimiento, tal como se define en las reivindicaciones, para aislar una toxina específica para una diana/receptor conocido que comprende las etapas de: exponer la diana/receptor a una biblioteca combinatoria de proteínas tal como se describe en las reivindicaciones; y aislar al menos una especie de proteína de la biblioteca combinatoria de proteínas capturada mediante la unión a la diana/receptor.

5 [0022] La memoria proporciona una biblioteca combinatoria de proteínas que comprende una pluralidad de especies de proteínas, comprendiendo cada especie de proteína una cadena A1 de una proteína tóxica en la que se ha introducido un inserto, en el que, el inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de al menos 2 residuos de aminoácidos; y el inserto se introduce en la parte de la cadena de A1 que sería un bucle sensible a proteasa si la cadena A1 fuera una cadena A de longitud completa.

10 [0023] La memoria proporciona una proteína mutante que comprende una cadena A1 de una proteína tóxica en la que se ha introducido un inserto, en el que, el inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de al menos 2 residuos de aminoácidos; y el inserto se introduce en la parte de la cadena de A1 que sería un bucle sensible a proteasa si la cadena A1 fuera una cadena A de longitud completa.

15 [0024] La memoria proporciona un procedimiento para identificar un ligando que se une a una diana/receptor específico, que comprende las etapas de: exponer las células que se sabe que poseen la diana/receptor a los miembros de una biblioteca combinatoria de proteínas tal como se describe en el presente documento; seleccionar los miembros de la biblioteca de proteínas que se observa que son tóxicos para las células; evaluar los miembros seleccionados de la biblioteca de proteínas para determinar la secuencia de la región insertada, mediante lo cual se identifica un péptido de la secuencia de la región insertada como un posible ligando para una diana/receptor en la célula; y adicionalmente probar péptidos de la secuencia de la región insertada para confirmar que son un ligando para la diana/receptor específico.

20 [0025] La memoria proporciona una biblioteca combinatoria de proteínas que comprende una pluralidad de especies de proteínas, comprendiendo cada especie de proteína una cadena A1 modificada de una proteína tóxica en la que se ha introducido un inserto, en el que, la cadena A1 modificada comprende una cadena A1 de tipo salvaje que contiene una mutación en uno de cisteína (tal como se define en las reivindicaciones); el inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de al menos 2 residuos de aminoácidos; y el inserto se introduce en la parte de la cadena A1 que sería un bucle sensible a proteasa si la cadena A1 fuera de longitud completa.

25 [0026] La memoria proporciona una proteína mutante que comprende una cadena A1 modificada de una proteína tóxica en la que se ha introducido un inserto, en el que, la cadena A1 modificada comprende una cadena A1 de tipo salvaje que contiene una mutación en uno de cisteína (tal como se define en las reivindicaciones); el inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de al menos 2 residuos de aminoácidos; y el inserto se introduce en la parte de la cadena A1 que sería un bucle sensible a proteasa si la cadena A1 fuera de longitud completa.

30 [0027] La memoria proporciona un procedimiento para identificar un ligando que se une a una diana/receptor específico, que comprende las etapas de: exponer las células que se sabe que poseen la diana/receptor a los miembros de una biblioteca combinatoria de proteínas tal como se describe en el presente documento; seleccionar los miembros de la biblioteca de proteínas que se observa que son tóxicos para las células; evaluar los miembros seleccionados de la biblioteca de proteínas para determinar la secuencia de la región insertada, mediante lo cual se identifica un péptido de la secuencia de la región insertada como un posible ligando para una diana/receptor en la célula; y adicionalmente probar péptidos de la secuencia de la región insertada para confirmar que son un ligando para la diana/receptor específico.

35 [0028] La memoria proporciona una biblioteca combinatoria de proteínas que tiene el inserto introducido en el extremo N-terminal de la secuencia de la cadena A en lugar de en la región del bucle sensible a proteasa.

40 [0029] La memoria describe un procedimiento para identificar un ligando que se une a una diana/receptor específico, que comprende las etapas de: exponer las células que se sabe que poseen la diana/receptor a los miembros de una biblioteca combinatoria de proteínas tal como se describe en el presente documento; seleccionar los miembros de la biblioteca de proteínas que se observa que son tóxicos para las células; evaluar los miembros seleccionados de la biblioteca de proteínas para determinar la secuencia de la región insertada, mediante lo cual se identifica un péptido de la secuencia de la región insertada como un posible ligando para una diana/receptor en la célula; y adicionalmente probar péptidos de la secuencia de la región insertada para confirmar que son un ligando para la diana/receptor específico.

45 Breve descripción de los dibujos

50 [0030]

55 La figura 1 es un diagrama esquemático que representa los dominios A1 y A2 de SLT-1 de tipo salvaje. La cadena A está compuesta por 293 aminoácidos. La cadena es escindida por furina para producir un fragmento catalítico A1 y una cola C-terminal A2 asociada no covalentemente con el pentámero B. Se define un bucle sensible a proteasa (área rallada) por los dos únicos residuos de cisteína en la cadena A (Cys 242 y 261). Tyr77, Glu167, Arg170 y Trp203 representan residuos importantes para la actividad catalítica del dominio A1 (flechas).

5 La figura 2A es una representación esquemática de la cadena A de SLT-1 (1-293) con el epítipo MUC1 asociado al cáncer de mama PDTRPAP (secuencia de control reconocida por el mAb One M27) insertado entre los residuos 245 y 246 y una etiqueta de 6-histidinas seguido por un sitio de escisión de la proteasa (tal como un sitio de escisión de furina o trombina) en su extremo N-terminal.

10 La figura 2B es una representación de una construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT-1 donde las tres posiciones del epítipo MUC1 reconocidas por el mAb One M27 son aleatorias (región XXX). La biblioteca de tripéptidos se insertó en una región bucle de origen natural de la cadena A creada por la presencia de un puente disulfuro entre Cys 242 y Cys 261.

15 La figura 2C es una representación de la construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT-1 de la figura 2B, en la que la cisteína 261 se ha mutado a una alanina. Cabe indicar que en este caso (como en muchos de las figuras siguientes) el puente de disulfuro presente en la figura 2B no se puede formar debido a la ausencia de una de las cisteínas.

La Figura 2D es una representación de la construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT-1 de la figura 2B, en la que la cisteína 242 se ha mutado a una alanina.

20 La figura 2E es una representación de la construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT-1 de la figura 2B, en el que la cisteína 242 y la cisteína 261 han sido ambas mutadas a residuos de alanina.

La figura 2F es una representación de la construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT-1 de la figura 2C, en la que el residuo C242 ha sido biotinilado.

25 La Figura 2G es una representación esquemática de la cadena A de SLT-1 (1-251) con el epítipo MUC1 asociado al cáncer de mama PDTRPAP (secuencia de control reconocida por el mAb One M27) insertado entre los residuos 245 y 246 y una etiqueta de histidinas seguido por un sitio de escisión de la proteasa (tal como un sitio de escisión de furina o trombina) en su extremo N-terminal.

30 La figura 2H es una representación de nuestra construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A1 de SLT-1, en la que las tres posiciones clave del epítipo MUC1 reconocidas por el mAb One M27 son aleatorias (región XXX).

35 La figura 2I es una representación de la construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A1 de SLT-1 de la figura 2H, en la que la cisteína 242 se ha mutado a una alanina.

La figura 2J es una representación de la construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A1 de SLT-1 de la figura 2H, en la que la cisteína 242 ha sido biotinilada.

40 La figura 3 muestra un conjunto de datos de ELISA representativos del cribado de 96 variantes de cadenas A individuales distintas de nuestra biblioteca de tripéptidos de cadena A de SLT-1 con mAb Onc M27. La variante de toxina # 41 (tablas 1 y 2) produjo una fuerte señal de ELISA y tenía el epítipo esperado.

45 La figura 4A muestra un diagrama esquemático de un segmento aleatorio de 7 aminoácidos insertado entre los residuos 245 y 246 de la cadena A.

La figura 4B muestra un diagrama esquemático de un segmento aleatorio de 7 aminoácidos insertado entre los residuos 245 y 246 de la cadena A, en el que la cisteína en la posición 261 se ha mutado a una alanina.

50 La figura 4C muestra un diagrama esquemático de un segmento aleatorio de 7 aminoácidos insertado entre los residuos 245 y 246 de la cadena A, en el que la cisteína en la posición 242 se ha mutado a una alanina.

La figura 4D muestra un diagrama esquemático de un segmento aleatorio de 7 aminoácidos insertado entre los residuos 245 y 246 de la cadena A, en el que la cisteína en las posiciones 242 y 261 se han mutado a alaninas.

55 La figura 4E muestra un diagrama esquemático de un segmento aleatorio de 7 aminoácidos insertado entre los residuos 245 y 246 de la cadena A, en el que la cisteína en la posición 261 se ha mutado a una alanina y la cisteína en la posición 242 se ha biotinilado.

60 La figura 4F muestra un diagrama esquemático de un segmento aleatorio de 7 aminoácidos insertado entre los residuos 245 y 246 de la cadena A1.

La figura 4G muestra un diagrama esquemático de un segmento aleatorio de 7 aminoácidos insertado entre los residuos 245 y 246 de la cadena A1, en el que el residuo de cisteína en la posición 242 se ha biotinilado.

65 La figura 4H muestra un diagrama esquemático de un segmento aleatorio de 7 aminoácidos insertado entre los

residuos 245 y 246 de la cadena A1, en el que el residuo de cisteína en la posición 242 se ha mutado a una alanina.

5 La figura 5 muestra los resultados de las pruebas en siete variantes de toxina que se identificaron como eliminadores repetibles de la línea celular de melanoma humano 518A2. El eje de abscisas representa el logaritmo de la concentración de toxina usada para tratar las células y el eje de ordenadas representa el porcentaje observado de células que son viables después de 48 horas. Los triángulos rellenos representan el efecto de la toxina de tipo salvaje en células 518A2, mientras que las dos variantes de cadena A más eficaces se denominaron SAM # 3 (cuadrados blancos) y SAM # 5 (símbolos X).

10 La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína SLT-1 de tipo salvaje de la figura 1. Las secuencias de aminoácidos se muestran desde el extremo N-terminal al C-terminal.

15 La figura 7A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT de la figura 2A, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

La Figura 7B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT de la figura 2A, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

20 La Figura 7C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT de la figura 2B, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

25 La Figura 7D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la construcción de la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT de la figura 2B, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

30 La figura 8A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT de las figuras 2C y 2F, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

La Figura 8B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT de las figuras 2C y 2F, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

35 La Figura 8C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT de la figura 2D, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

40 La Figura 8D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT de la figura 2D, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

La figura 9A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT de la figura 2E, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

45 La figura 9B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la biblioteca de tripéptidos de la cadena A de SLT de la figura 2E, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

50 La figura 9C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de la figura 2G, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

55 La figura 9D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de la figura 2G, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

La figura 10A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de las figuras 2H y 2J, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

60 La figura 10B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de las figuras 2H y 2J, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

65 La figura 10C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de la figura 2I, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

La figura 10D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de la figura 2I, con un

ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

5 La figura 11A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT-1 de la figura 4A, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

10 La figura 11B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT-1 de la figura 4A, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

La figura 11C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT-1 de las figuras 4B y 4E, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

15 La figura 11D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT-1 de las figuras 4B y 4E, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

20 La figura 12A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT-1 de la figura 4C, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

La figura 12B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT-1 de la figura 4C, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

25 La figura 12C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT-1 de la figura 4D, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

30 La figura 12D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A de SLT-1 de la figura 4D, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

La figura 13A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de las figuras 4F y 4G, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

35 La figura 13B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de las figuras 4F y 4G, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

40 La figura 13C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de la figura 4H, menos las etiquetas N-terminal (la etiqueta de His y el sitio de escisión por proteasa).

La figura 13D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la cadena A1 de SLT-1 de la figura 4H, con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

45 La figura 14A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A de SLT-1, con la cisteína 261 mutada a una alanina.

50 La figura 14B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A de SLT-1, con la cisteína 261 mutada a una alanina, y con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

La figura 14C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A de SLT-1, con la cisteína 242 mutada a una alanina.

55 La figura 14D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A de SLT-1, con la cisteína 242 mutada a una alanina, y con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

60 La figura 15A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A de SLT-1, con las cisteínas 242 y 261 mutadas a alaninas.

65 La figura 15B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A de SLT-1, con las cisteínas 242 y 261 mutadas a alaninas, y con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

La figura 15C muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A1 de SLT-1.

La figura 15D muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A1 de SLT-1 con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

La figura 16A muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A1 de SLT-1, con la cisteína 242 mutada a una alanina.

La figura 16B muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región A1 de SLT-1, con la cisteína 242 mutada a una alanina, y con un ejemplo de una posible etiqueta N-terminal, que comprende una etiqueta de 8-His y un sitio de escisión por proteasa.

Para las figuras 6-16 que incluyen la etiqueta N-terminal, la etiqueta puede variar según sea necesario; por ejemplo, se puede utilizar la etiqueta KGMRSHHHHHHHHRVARAS en lugar de KGMRSHHHHHHHHIEGRAS.

Descripción detallada de la invención

[0031] La presente invención se refiere a una biblioteca combinatoria de proteínas, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una pluralidad de especies de proteínas, comprendiendo cada especie de proteína una cadena A de una proteína de la toxina de tipo Shiga 1 en la que un inserto ha sido introducido. El inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 3 a 200 residuos de aminoácidos; y se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. La biblioteca proporciona una colección de especies de proteínas que se pueden cribar para proteínas individuales que son tóxicas contra determinados tipos de células, tales como tipos de células cancerosas específicas. Las especies de proteínas individuales seleccionadas de este modo se usan adecuadamente en el tratamiento del cáncer.

[0032] Tal como se utiliza en la memoria y las reivindicaciones de esta solicitud, el término "biblioteca combinatoria" se refiere a una mezcla de especies, cada una de las cuales tiene una parte común y una parte variable. En el caso de una "biblioteca combinatoria de proteínas" cada una de las especies es una proteína o péptido, y las partes comunes y las partes variables son cada una secuencias de aminoácidos. En el caso de una biblioteca combinatoria de expresión, las especies son microorganismos, vectores de expresión o polinucleótidos que, cuando se expresan, producen proteínas o péptidos que tienen partes comunes y partes variables. En este caso, las partes comunes y las partes variables son cada una secuencias de nucleótidos. Dado que el propósito de la biblioteca combinatoria es proporcionar múltiples variantes para fines de cribado, la biblioteca combinatoria contiene preferiblemente al menos 100 especies distintas de proteína o unidades expresión, más preferiblemente al menos 1000 especies distintas.

[0033] Tal como se utiliza en la memoria, el término "proteína tóxica heterómera" se refiere a la clase de toxinas proteicas que tienen en común que la organización es heterómera en la naturaleza con dos o más dominios o subunidades de polipéptido responsables de distintas funciones (Merritt, EA y Hoi, WGJ (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:165 1). En dichas proteínas, las dos o más subunidades o dominios podrían referirse como A y B, y las toxinas como toxinas AB_x, donde x representa el número de subunidades B idénticas u homólogas en la toxina. Esta familia de toxinas relacionadas por la estructura incluye ejemplos, tales como Shiga y toxinas de tipo Shiga, las enterotoxinas termolábiles de E. coli, la toxina del cólera, la toxina de la difteria, la toxina pertussis, la exotoxina A de Pseudomonas aeruginosa, así como toxinas vegetales tales como ricina y abrina. En base de su capacidad para bloquear la síntesis de proteínas, las proteínas, tales como toxinas de Shiga y de tipo Shiga, así como ricina, abrina, gelonina, crotina, proteína antiviral de fitolaca, saporina, momordina, modicina, sarcina, toxina de la difteria y exotoxina A se han referido como proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP). En estas proteínas tóxicas heterómeras de origen natural, la cadena A es la parte tóxica, mientras que las cadenas B forman un grupo de unión que se une a un receptor en una célula susceptible a la toxina, liberando de esta forma la cadena A a la célula. En muchos casos, la cadena A se ha caracterizado adicionalmente por tener dos dominios, un dominio A1 y un dominio A2. Habitualmente, el dominio de A1 incluye los elementos citotóxicos de la subunidad A y una parte de la parte de bucle sensible a proteasa, pero a menudo no incluye la parte de unión de la cadena B.

[0034] Un ejemplo específico de la cadena A de una proteína tóxica heterómera es la cadena A de SLT-1 que tiene la secuencia indicada en la SEQ. ID N ° 1. La cadena A de SLT-1 comprende 293 aminoácidos con el dominio enzimático (tóxico) que abarca los residuos 1 a 239. Un bucle sensible a proteasa que abarca los residuos 242 a 261 está normalmente expuesto, y es un sitio adecuado para insertar una secuencia peptídica. La cadena A de SLT-1 se caracteriza por tener un dominio A1, que abarca los residuos 1 a 251, e incluye todo el dominio enzimático (tóxico), y un dominio A2 que abarca los residuos 252-261.

[0035] La SLT-1 es una proteína inactivadora de ribosomas de tipo II producida por la cepa patogénica de Escherichia coli (0157: H7) (24). La SLT-1 es un complejo AB5 de aproximadamente 70 kD (O'Brien, AD, y Holmes, RK (1987) Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol Rev 51, 206-220.). La única subunidad A catalítica de 32 kD está asociada de forma no covalente con un pentámero de cinco subunidades B idénticas de 7,7 kD. El pentámero de subunidades B reconoce el glicolípido globotriaosilceramida (también conocido como CD77 o Gb3) en la superficie de las células diana (Lingwood, C.A. (1993) Verotoxins and their glycolipid receptors. Adv Lipid Res. 25, 189-211;

Jacewicz, et al. (1986) Pathogenesis of shigella diarrhea. XI. Isolation of a shigella toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *J Exp Med* 163, 1391-1404). Un bucle sensible a proteasa situado entre Cys242 y 261 en el extremo C terminal de la cadena A se escinde por la furina durante la ruta celular (figura 1). La cadena A permanece asociada con su pentámero de subunidades B debido a un enlace disulfuro intracatenario entre Cys242 y Cys261 a medida que va al lumen de RE (Sandvig, et al. (1989) Endocytosis from coated pits of Shiga toxin: a glycolipid-binding protein from *Shigella dysenteriae* 1. *J Cell Biol.* 108, 1331-1343; 32. Garred, et al. (1995) Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of Shiga toxin and toxin mutants. *Exp. Cell Res.* 218, 39-49.). El enlace disulfuro es finalmente reducido en el lumen de RE y la cadena A1 (primeros 251 aa) se libera y posteriormente se retrotransloca al citosol donde inactiva a los ribosomas (O'Brien, et al (1992) Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 180, 65-94.). Más específicamente, la cadena A de SLT-1 es una N-glicosidasa que escinde catalíticamente un nucleótido de adenina específico (4324) del ARNr 28 S (Brigotti, et al. 1997) The RNA-N-glycosidase activity of Shiga-like toxin I: kinetic parameters of the native and activated toxin. *Toxicon* 35, 1431-1437.). Este evento conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas mediante la prevención de la unión de los ARNt aminoacilo al ribosoma y la detención del alargamiento de proteínas. Estudios de mutagénesis, así como de análisis estructural, realizados en las cadenas A de ST y ricina han trazado residuos conservados clave implicados en la actividad catalítica (Deresiewicz, et al. (1992) Mutations affecting the activity of the Shiga-like toxin I A-chain. *Biochemistry* 31, 3.272-3.280; Ready, et al. (1991) Site-directed mutagenesis of ricin A-chain and implications for the mechanism of action. *Proteins* 10, 270-278). Los residuos importantes para la actividad catalítica de SLT-1 son la tirosina 77, el ácido glutámico 167, la arginina 170 y el triptófano 203 (Hovde, et al. (1988) Evidence that glutamic acid 167 is an active-site residue of Shiga-like toxin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 2568-2572; Yamasaki, et al. (1991) Importance of arginine at position 170 of the A subunit of Vero toxin 1 produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* for toxin activity. *Microb Pathog* 11, 1-9). Además, la unión de la toxina a la superficie celular es importante para la introducción en la célula y por lo tanto para la actividad tóxica. Debido a esto la cadena A por sí sola no es significativamente tóxica.

[0036] Además de la cadena A o A1 de SLT-1, también se pueden usar otras toxinas para formar bibliotecas y composiciones descritas en el presente documento, y se pueden utilizar en los procedimientos descritos en el presente documento. Específicamente, se describen en el presente documento Shiga y otras toxinas similares a Shiga, así como ricina, abrina, gelonina, crotina, proteína antiviral de fitolaca, saporina, momordina, modicina, sarcina, toxina de la difteria y exotoxina A, y otras proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP) funcionalmente relacionadas.

[0037] Para los propósitos de fabricar la biblioteca combinatoria de la invención, se insertan secuencias cortas de aminoácidos de 3 a 200 residuos de aminoácidos de longitud en este bucle sensible a proteasa. El número de aminoácidos en el inserto define el número de posibles variantes aleatorias que puede haber en la biblioteca. Por ejemplo, cuando el número de aminoácidos en el inserto es 3, el número máximo de variantes es 20^3 u 8000 variantes. Insertos más grandes proporcionan un mayor número correspondiente de posibles variantes. También se ha encontrado que otras regiones de la cadena A o A1 se pueden utilizar para insertar las secuencias de aminoácidos cortas. Los presentes inventores han demostrado, por ejemplo, que la región N terminal puede soportar insertos de secuencias de aminoácidos de largas sin una pérdida significativa de actividad.

[0038] Como alternativa al uso de insertos con secuencias puramente aleatorias, pueden diseñarse insertos basados en una plantilla conocida. Por ejemplo, tal como se describe a continuación en el contexto de Muc-1, se pueden usar variaciones en una secuencia conocida para proporcionar propiedades de unión al receptor para un tipo de célula particular para identificar un inserto que proporciona la optimización de las propiedades tóxicas de la construcción de la proteína. Esta misma optimización puede realizarse en una secuencia individual aislada mediante el cribado de una biblioteca combinatoria más grande. Se entenderá, sin embargo, que el inserto en las pruebas de estudio preliminar de eficacia del ejemplo 1 usa un inserto que es la diana/receptor, mientras que en el caso real el inserto se basaría en la secuencia de un ligando conocido para ser optimizado para la máxima eficacia y especificidad.

[0039] Esta estrategia, en la que se reconoce un tipo de receptor específico conocido, ilustra un aspecto adicional descrito en el presente documento, a saber, un procedimiento para identificar ligandos peptídicos que se unen a dianas/receptores específicos, tales como marcadores tumorales que se sabe que existen en las células cancerosas. En este procedimiento, se criba una biblioteca combinatoria de proteínas de acuerdo con la invención frente a células que se sabe que poseen la diana/receptor. La toxina sirve como reportero, de tal manera que se evalúan las proteínas que muestran ser tóxicas para las células para determinar la secuencia de la región insertada. Los péptidos de esta secuencia se pueden utilizar a continuación en combinación con una toxina u otras moléculas, para dirigir compuestos a células que poseen la diana/receptor. Pueden ser apropiados ensayos adicionales de péptidos de la secuencia de la región insertada para confirmar que son un ligando para la diana/receptor específico, en lugar de a algún otro receptor en el tipo de célula. Esto puede realizarse usando ensayos de unión con receptor aislado donde están disponibles.

[0040] Estos insertos utilizados en alternativa a insertos con secuencias puramente aleatorias pueden utilizar, como plantilla conocida, una molécula pequeña de proteína con una estructura plegada conocida o deseable, para

5 aumentar la sensibilidad o la especificidad de la unión. Por ejemplo, se puede insertar un dominio de tipo inmunoglobulina, tal como una secuencia de molécula FC, un fragmento de una secuencia de molécula FC, o un análogo de una secuencia de molécula FC. Por lo tanto, se pueden crear bibliotecas con una región de dominio de cadena variable de una molécula FC, o un tramo de 7 unidades aleatorias (o secuencia aleatoria de otra longitud) insertados en la región variable de una molécula FC, a su vez insertada en la región del bucle sensible a proteasa de la molécula A.

10 **[0041]** La presente invención también proporciona un procedimiento, tal como se indica en las reivindicaciones, para identificar sustancias tóxicas específicas para un marcador celular conocido, y particularmente marcadores que están disponibles en forma aislada. En esta realización de la invención, la toxina no necesita servir como reportero. Por lo tanto, las células que tienen el marcador, o una diana/receptor aislado, si están disponibles, se exponen a la biblioteca combinatoria de proteínas. En realizaciones preferidas, las células o la diana/receptor aislado se inmovilizan sobre un soporte sólido, tal como en pocillos de plástico. Las proteínas capturadas de la biblioteca a continuación se vuelven a cribar frente a las células para confirmar su toxicidad y especificidad para las células que expresan la diana/receptor y su idoneidad para el uso como agente terapéutico. Este procedimiento se puede utilizar para identificar toxinas con insertos de unión específicos para cualquier marcador tumoral o receptor celular, incluyendo, sin limitación, marcadores tumorales, tales como las mucinas, tales como MUC-1 y sus glicofomas, Her-2, Her2-Neu, marcadores de tirosina quinasa, EGFR, GD2, y GD3.

20 **[0042]** De este modo, de acuerdo con este aspecto específico de la invención, un procedimiento para aislar una toxina específica para una diana/receptor conocido, tal como se define en las reivindicaciones, y comprende las etapas de:

25 (a) exponer la diana/receptor a una biblioteca combinatoria de proteínas, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende una pluralidad de especies de proteínas, comprendiendo cada especie de proteína una cadena A de una proteína de toxina de tipo Shiga 1 en la que se ha introducido un inserto, en el que, el inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 3 a 200 residuos de aminoácidos; y

30 el inserto se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A; y
 (b) aislar al menos una especie de proteína de la biblioteca combinatoria de proteínas capturada por unión a la diana/receptor. Tal como se utiliza en la memoria y las reivindicaciones de la misma, el término "aislamiento" se refiere a cualquier mecanismo para obtener una composición que contiene la proteína separada del entorno en el que se expresa en una forma adecuada para su posterior análisis. Esto incluiría la liberación de la diana/receptor después de la captura (por ejemplo, mediante exposición a un agente de unión competitiva) o el aislamiento de un cultivo de un clon que expresa la proteína que se captura. El procedimiento puede comprender además la etapa de cribado de la proteína aislada frente a células que expresan la diana/receptor, para confirmar su toxicidad para las células que expresan la diana/receptor. Los procedimientos adecuados para este cribado se describen en el ejemplo 3. Tal como se indica anteriormente, en este procedimiento, la diana/receptor puede ser una diana/receptor purificado y puede estar inmovilizado sobre un soporte sólido. La diana/receptor también puede estar sobre la superficie de células que puede estar inmovilizada. Cuando la diana/receptor está sobre la superficie de las células, la toxina puede servir como reportero, y la muerte de las células es indicativa de la unión al receptor.

45 **[0043]** Nuestra experiencia con la construcción de bibliotecas de SLT-1 ha señalado una serie de cuestiones prácticas que se consideran adecuadamente en la selección de una plantilla de proteínas para la construcción de bibliotecas combinatorias. Un factor importante es elegir una proteína de cadena única, preferiblemente una proteína bacteriana de menos de 300 aminoácidos (si las bibliotecas se expresarán en procariontes). El uso de una toxina más pequeña aumenta su potencial para penetrar en tumores sólidos y reduce su inmunogenicidad. En segundo lugar, la plantilla de proteínas debe plegarse espontáneamente en solución en su forma activa, de tal manera que existe una necesidad mínima de chaperonas del huésped. Se debe evitar, por ejemplo, los armazones ("scaffold") que contienen múltiples residuos de cisteína que normalmente participan en los puentes disulfuro. Además, una proteína de cadena única en lugar de un complejo de múltiples subunidades puede exportarse más fácilmente a partir de bacterias. En tercer lugar, la plantilla de proteínas debe poseer una actividad enzimática que rápidamente se pueda medir para confirmar el plegamiento apropiado de las variantes de péptido que contengan mutaciones dirigidas al sitio individuales y múltiples. En cuarto lugar, debe incorporarse una estrategia de cribado sencilla en el diseño de bibliotecas combinatorias. Dichas búsquedas deben ser susceptibles de procedimientos de cribados de alto rendimiento. La cadena A catalítica de SLT-1 (residuos 1 a 293) y la cadena A1 de SLT-1 (residuos 1-251) cumplen con estos criterios, ya que son una sola cadena que carecen de cualquier función de unión a receptor conocido, y que tienen estructuras y sitios catalíticos bien definidos.

60 **[0044]** También se ha encontrado que las cisteínas 242 y 261 de la cadena A de SLT-1 pueden sustituirse mediante mutagénesis específica de sitio (o en cualquier caso, modificarse) con el fin de eliminar el único puente disulfuro presente entre estas dos cisteínas en la cadena A. Dichas mutaciones ventajosas eliminan la necesidad de reducir la cadena de péptido durante la purificación y proporcionan una estrategia más sencilla para la purificación de toxinas de cadena única que comprenden el dominio A1 de mutantes de la cadena A. Se ha encontrado que la cisteína 242 o la cisteína 261, o ambas, se pueden mutar de esta manera. La cisteína o cisteínas se pueden mutar a alanina, aunque otras mutaciones pueden dar como resultado el mismo efecto deseado proporcionando a la vez una cadena A o A1 adecuada.

[0045] Otra ventaja de la mutación de cisteínas de esta manera resulta de la mutación de C242 o C261 (preferiblemente, C261). Esto da lugar a una cadena A de proteína de tipo Shiga con una sola cisteína. Por tanto, el grupo tiol asociado con este único residuo de cisteína es libre y ofrece la oportunidad de introducir sondas espectroscópicas (derivados de cromóforos fluorescentes que reaccionan con el grupo tiol), radioactivas (complejos de iones pesados o quelantes de metales pesados reactivos con tiol) o bioquímicas (por ejemplo, biotina). Estas variantes de cadena A, marcadas con sondas reporteras, se pueden utilizar a continuación como agentes para aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se puede utilizar una variante de cadena única A o A1 inactivada, marcada con una sonda reportera (e inactivada mediante la mutación E167A y R170A) como una sonda no tóxica, tal como se ha descrito anteriormente, para determinar qué población de pacientes puede beneficiarse de ser tratada con cuál de las correspondientes variantes de cadena única con actividad catalítica. También se puede utilizar una biblioteca de variantes de cadena única A1 inactivada marcada de esta manera para determinar qué dominios de unión (de dicha biblioteca) son eficaces, para determinar qué dominios de unión pueden utilizarse en las correspondientes variantes de cadena única catalíticamente activas para el tratamiento de un paciente. Alternativamente, se pueden utilizar estas sondas no tóxicas para determinar qué dominios de unión (de la biblioteca mutada aleatoriamente) se pueden utilizar para reconocer la población de células deseada y usarse en la subunidad tóxica, o unirse a un agente terapéutico separado y conocido, para reconocer y tratar esa población celular. Alternativamente, una vez se ha identificado un miembro específico deseado de la biblioteca, ya sea a través de estudios de unión tal como se describió anteriormente o de otra manera, ese miembro específico de la biblioteca (por ejemplo, una cadena A1 con una secuencia deseable específica de 7 unidades insertada después del aminoácido 245) se puede biotinilar para una purificación adicional u otros estudios.

[0046] Alternativamente, se puede biotinilar toda la biblioteca, lo cual permite que la biblioteca se analice con un ensayo basado en receptores en lugar de un ensayo basado en toxinas.

[0047] También se ha encontrado sorprendentemente que el uso del dominio A1 de la cadena A es suficiente para realizar los ensayos descritos en el presente documento. Aunque el dominio A1 contiene la totalidad del dominio citotóxico de la subunidad A, no se conocía hasta saber qué función desempeñaba la subunidad A2 en ensayos de este tipo, y si la subunidad A1 podría utilizarse con éxito por sí sola en este tipo de ensayo. Mediante la eliminación de la parte A2 de la cadena A, se puede utilizar un fragmento más pequeño manipulado más fácilmente en los ensayos descritos en el presente documento.

[0048] Combinando el hallazgo inesperado de que las mutaciones de cisteína dan como resultado una subunidad A funcional útil en los ensayos descritos en el presente documento, con el hallazgo de que la subunidad A1 se puede utilizar sola se aporta la ventaja adicional de la combinación de estos dos resultados. Mediante la mutación de una de las cisteínas (por ejemplo, C261), se puede fabricar una proteína que no puede formar el bucle de cadena A sensible a proteasa (ya que este bucle de cadena A sensible a proteasa es el resultado de las interacciones de cisteína-cisteína entre C242 y C261). Por tanto, la subunidad A se puede escindir de manera más eficiente en las subunidades A1 y A2. De este modo, la mutación de al menos uno de C242 y C261, combinada con la utilización de la subunidad A1 sola, proporciona una estrategia más sencilla y elegante para la purificación de toxinas de cadena única que comprenden el dominio A1 de mutantes de cadena A. De este modo, la fabricación, y purificación, de una proteína o una biblioteca de proteínas de uso en los ensayos descritos en el presente documento se convierte en mucho más eficiente, ya sea utilizando el dominio A1 solo, al menos una mutación de cisteína, o ambos.

[0049] Un aspecto adicional descrito en el presente documento es una biblioteca combinatoria de expresión que comprende una pluralidad de especies de sistemas de expresión. Cada especie dentro de la biblioteca de expresión expresa una especie de proteína que comprende una cadena A o A1 de una proteína tóxica heterómera en la que se ha introducido un inserto. El inserto es un polipéptido de secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 2 o más residuos de aminoácidos, por ejemplo de 3 a 200 residuos de aminoácidos; y se introduce en el bucle sensible a proteasa de la secuencia de la cadena A. Los sistemas de expresión adecuados incluyen plásmidos y vectores virales.

[0050] La cadena A puede pegarse, o en cualquier caso modificarse, mediante un procedimiento conocido en la técnica con el fin de estabilizar o modificar la vida media biológica de la proteína. Los agentes reactivos de pegilación se pueden unir a una lisina, al extremo N-terminal, o a la cisteína 242 ó 261.

[0051] También se ha encontrado que la adición de una etiqueta de histidina (por ejemplo, una etiqueta de 6 u 8 histidinas) al extremo N-terminal de la cadena A o A1 es ventajosa, ya que permite una mejor purificación de la proteína deseada. Opcionalmente, se puede insertar una región sensible a la proteasa entre la etiqueta de histidina y el resto de la cadena A o A1 con el fin de facilitar la escisión de la etiqueta de histidina de la cadena A o A1, una vez que ya no se desea. Los ejemplos de regiones sensibles a proteasa que se pueden usar incluyen una región sensible a trombina o una región sensible a furina. En la técnica también se conocen otras secuencias sensibles a proteasa.

[0052] La invención se describirá a continuación adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1**Prueba de concepto: diseño y producción de una biblioteca de tripéptidos de cadena A prototipo**

5 [0053] Originalmente se creó una biblioteca de tripéptidos sencillo insertados en el bucle sensible a proteasa C-terminal de la cadena A de SLT-1 (figuras 2A y B). Esta región de bucle de la cadena A está restringida de forma natural debido a la presencia de un único enlace disulfuro que une Cys242 a Cys261. De este modo, se puede calcular que la diversidad máxima de esta biblioteca es de 20^3 ó 8000 permutaciones de una secuencia de tripéptido. Como prueba de concepto de que las bibliotecas de cadena A se pueden cribar fácilmente por una nueva actividad de unión al receptor, se recogieron más de 3000 colonias de esta biblioteca de tripéptidos de cadenas A y se purificó la toxina mutante producida por cada clon. Se observó muy temprano en este estudio que el nivel de expresión de un mutante de cadena A aumentó drásticamente cuando se expresó en presencia de la subunidad B de SLT-1 de tipo salvaje. De este modo, las formas mutantes de la cadena A se expresaron y purificaron inicialmente como variantes de la toxina AB5. Dado que todas las subunidades A albergan una etiqueta de purificación de poliHis, es relativamente fácil eliminar la subunidad B con agentes desnaturalizantes (urea por ejemplo), a la vez que se recupera la cadena A en columnas o partículas de afinidad de metal. Las transferencias Western realizadas en clones bacterianos seleccionados al azar indicaron que > 70% de estas colonias produjeron cantidades significativas de estos mutantes de cadena A.

20 [0054] A continuación, estas variantes de toxina se recubrieron en pocillos individuales de placas de 96 pocillos y se cribaron mediante ELISA por su capacidad para unirse al anticuerpo monoclonal Onc M27 (Linsley, et al. (1988) Monoclonal antibodies reactive with mucin glycoproteins found in sera from breast cancer patients. Cancer Res. 48, 2138-2148.), dirigido al epítipo tripéptido de cáncer de mama bien caracterizado Thr-Arg-Pro de la repetición en tándem de MUC1 humano Gendler, et al. (1988) A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. J Biol. Chem. 263, 12820 a 12823; Girling, et al. (1989) A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. Int J Cancer 43, 1072-1076). Tal como se muestra en las Tablas 1 y 2, la mayoría de los mutantes de la cadena A no codificaban el inserto de tripéptido que se correspondía con el epítipo reconocido de Onc M27, ni eran reconocidos por el anticuerpo. Sin embargo, en dos ocasiones, una variante de toxina que albergaba el epítipo exacto (Tabla 1, figura 3) produjo una fuerte señal de ELISA comparable a la observada con la cadena A de control que albergaba el epítipo de tripéptido de MUC1 y tenía la secuencia de epítipo esperada en su región de tripéptido aleatorizada. En la figura 3 se presenta un conjunto de datos de ELISA típico para 96 mutantes de la cadena A, destacando el hecho de que la mayoría de los mutantes de la cadena A no reconocían el mAAb Onc M27, excepto una variante de la cadena A (mutante # 41 en las Tablas 1 y 2). Estos resultados establecieron claramente que se pueden construir fácilmente bibliotecas de cadena A y cribarse para encontrar variantes de la toxina capaces de reconocer específicamente un receptor determinado, en este caso un sitio de combinación de antígeno.

Ejemplo 2**Prueba de concepto: diseño y producción de una biblioteca de tripéptidos de cadena A1 prototipo**

45 [0055] Se prepara una biblioteca de tripéptidos insertados en el dominio A1 de SLT-1 C-terminal. Se inserta una biblioteca de tripéptidos sencillos en el bucle sensible a proteasa C-terminal de la cadena A de SLT-1 (figuras 2A y B). Esta región de bucle de la cadena A está restringida de forma natural debido a la presencia de un único enlace disulfuro que une Cys242 a Cys261. De este modo, se puede calcular que la diversidad máxima de esta biblioteca es de 20^3 ó 8000 permutaciones de una secuencia de tripéptido. Las bibliotecas de cadena A se pueden cribar fácilmente por una nueva actividad de unión al receptor. Se recogen más de 3000 colonias de esta biblioteca de tripéptidos de cadenas A y se purifica la toxina mutante producida por cada clon. El nivel de expresión de un mutante de cadena A aumenta drásticamente cuando se expresa en presencia de la subunidad B de SLT-1 de tipo salvaje. De este modo, las formas mutantes de la cadena A se expresan y purifican inicialmente como variantes de la toxina AB5. Dado que todas las subunidades A albergan una etiqueta de purificación de poliHis, es relativamente fácil eliminar la subunidad B con agentes desnaturalizantes (urea por ejemplo), a la vez que se recupera la cadena A en columnas o partículas de afinidad de metal. Las transferencias Western realizadas en clones bacterianos seleccionados al azar indicaron que > 70% de estas colonias producen cantidades significativas de estos mutantes de cadena A. A continuación, se escinde la subunidad A1 de los mutantes de la cadena A, usando una escisión por proteasa, usando furina (figuras 2G y H).

60 [0056] A continuación, estas variantes de toxina se recubren en pocillos individuales de placas de 96 pocillos y se criban mediante ELISA por su capacidad para unirse al anticuerpo monoclonal Onc M27 (Linsley, et al. (1988) Monoclonal antibodies reactive with mucin glycoproteins found in sera from breast cancer patients. Cancer Res. 48, 2138-2148.), dirigido al epítipo tripéptido de cáncer de mama bien caracterizado Thr-Arg-Pro de la repetición en tándem de MUC1 humano Gendler, et al. (1988) A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. J Biol. Chem. 263, 12820 a 12823; Girling, et al. (1989) A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is

selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int J Cancer* 43, 1072-1076). La mayoría de los mutantes de la cadena A1 no codifican el inserto de tripéptido que se corresponde con el epítipo reconocido de Onc M27, ni son reconocidos por el anticuerpo. Sin embargo, en varias ocasiones, una variante de toxina que alberga el epítipo exacto produce una fuerte señal de ELISA comparable a la observada con la cadena A de control que alberga el epítipo de tripéptido de MUC1 y tiene la secuencia de epítipo esperada en su región de tripéptido aleatorizada. Estos resultados establecen claramente que se pueden construir fácilmente bibliotecas de cadena A1 y cribarse para encontrar variantes de la toxina capaces de reconocer específicamente un receptor determinado, en este caso un sitio de combinación de antígeno.

10 **Ejemplo 3**

Prueba de concepto: procedimiento alternativo para el diseño y producción de una biblioteca de tripéptidos de cadena A1 prototipo

15 **[0057]** Se prepara una biblioteca de tripéptidos insertados en el dominio A1 de SLT-1 C-terminal. Se inserta una biblioteca de tripéptidos sencillos en el bucle sensible a proteasa C-terminal de la cadena A1 de SLT-1 (figuras 2G y H). Este dominio A1 codifica la los aminoácidos 1-251 de la región A. De este modo, se puede calcular que la diversidad máxima de esta biblioteca es de 20^3 ó 8000 permutaciones de una secuencia de tripéptido. Las bibliotecas de cadena A se pueden cribar fácilmente por una nueva actividad de unión al receptor. Se recogen más de 3000 colonias de esta biblioteca de tripéptidos de cadena A1 y se purifica la toxina mutante producida por cada clon. Dado que todas las subunidades A1 carecen de una zona de unión a la subunidad B, es relativamente fácil escindir cualquier subunidad B. Opcionalmente, se pueden utilizar etiquetas poliHis para purificar adicionalmente las subunidades A1, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

25 **[0058]** A continuación, estas variantes de toxina se recubren en pocillos individuales de placas de 96 pocillos y se criban mediante ELISA por su capacidad para unirse al anticuerpo monoclonal Onc M27 (Linsley, et al. (1988) Monoclonal antibodies reactive with mucin glycoproteins found in sera from breast cancer patients. *Cancer Res.* 48, 2138-2148.), dirigido al epítipo tripéptido de cáncer de mama bien caracterizado Thr-Arg-Pro de la repetición en tándem de MUC1 humano Gendler, et al. (1988) A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J Biol. Chem.* 263, 12820 a 12823; Girling, et al. (1989) A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas. *Int J Cancer* 43, 1072-1076). La mayoría de los mutantes de la cadena A1 no codifican el inserto de tripéptido que se corresponde con el epítipo reconocido de Onc M27, ni son reconocidos por el anticuerpo. Sin embargo, en varias ocasiones, una variante de toxina que alberga el epítipo exacto produce una fuerte señal de ELISA comparable a la observada con la cadena A de control que alberga el epítipo de tripéptido de MUC1 y tiene la secuencia de epítipo esperada en su región de tripéptido aleatorizada. Estos resultados establecen claramente que se pueden construir fácilmente bibliotecas de cadena A1 y cribarse para encontrar variantes de la toxina capaces de reconocer específicamente un receptor determinado, en este caso un sitio de combinación de antígeno.

40 **[0059]** La biblioteca de tripéptidos de A1 también se puede biotinilar en la posición C242 (figura 2J). A continuación, se puede utilizar un ensayo de biotina estándar para determinar si un miembro de la biblioteca de tripéptidos de A1 está presente o unido a un sustrato o receptor determinado.

45 **Ejemplo 4**

Prueba de concepto: Procedimiento para el diseño y la producción de una biblioteca de tripéptidos de cadena A prototipo con una mutación en C242 y/o C261

50 **[0060]** Se prepara una biblioteca de tripéptidos insertados en el dominio A de SLT-1 C-terminal, utilizando el procedimiento del Ejemplo 1 con la modificación de que la codificación de la cisteína en la posición 242 y/o la posición 261 se ha mutado a una alanina mediante mutagénesis dirigida al sitio (figuras 2C, 2D, o 2E). Para las bibliotecas que contienen una cisteína en la cadena A, la biblioteca de tripéptidos está opcionalmente biotinilada (figura 2F). Las bibliotecas de cadena A se pueden cribar fácilmente para una nueva actividad de unión al receptor. Los resultados indican que estas bibliotecas de cadena A modificadas con Cys a Ala son al menos tan eficaces como las bibliotecas de tipo salvaje del Ejemplo 1 en la facilidad de construcción y el cribado para encontrar variantes de la toxina capaces de reconocer específicamente un receptor determinado. En el caso de las bibliotecas biotiniladas, se utilizan fácilmente marcadores de biotina, utilizando procedimientos conocidos, para identificar si un miembro de la biblioteca de cadena A está presente o unido a una muestra.

60 **Ejemplo 5**

Prueba de concepto: Procedimiento para el diseño y la producción de una biblioteca de tripéptidos de cadena A1 prototipo con una mutación en C242 y/o C261

65 **[0061]** Se prepara una biblioteca de tripéptidos insertados en el dominio A1 de SLT-1 C-terminal, utilizando el

procedimiento del Ejemplo 2 con la modificación de que la codificación de la cisteína en la posición 242 y/o la posición 261 se ha mutado a una alanina mediante mutagénesis dirigida al sitio (figura 2I). Las bibliotecas de cadena A1 se pueden cribar fácilmente para una nueva actividad de unión al receptor. Los resultados indican que estas bibliotecas de cadena A1 modificadas con Cys a Ala son al menos tan eficaces como las bibliotecas de tipo salvaje del Ejemplo 1 en la facilidad de construcción y el cribado para encontrar variantes de la toxina capaces de reconocer específicamente un receptor determinado. Los resultados indican que estas bibliotecas de cadena A1 modificadas con Cys a Ala son significativamente más fáciles de producir y purificar, debido a la falta del puente disulfuro entre Cys 242 y Cys 261, dando como resultado una escisión mucho más fácil de A2 de A1 en la etapa de escisión por proteasa. En el caso de una biblioteca de tripéptidos de A1 que tiene una cisteína en la posición C242, la cisteína está opcionalmente etiquetada con biotina (figura 2J). Esto permite determinar si el miembro de la biblioteca está presente o unido a un sustrato o un receptor utilizando procedimientos conocidos.

Ejemplo 6

Prueba de concepto: Procedimiento para el diseño y la producción de una biblioteca de tripéptidos de cadena A1 prototipo con una mutación en C242 y/o C261

[0062] Se prepara una biblioteca de tripéptidos insertados en el dominio A1 de SLT-1 C-terminal, utilizando el procedimiento del Ejemplo 3 con la modificación de que la codificación de la cisteína en la posición 242 se ha mutado a una alanina mediante mutagénesis dirigida al sitio (figura 2I). Las bibliotecas de cadena A1 se pueden cribar fácilmente para una nueva actividad de unión al receptor. Los resultados indican que estas bibliotecas de cadena A1 modificadas con Cys a Ala son al menos tan eficaces como las bibliotecas de tipo salvaje del Ejemplo 4 en la facilidad de construcción y el cribado para encontrar variantes de la toxina capaces de reconocer específicamente un receptor determinado.

Ejemplo 7

Fabricación de una biblioteca combinatoria de heptapéptidos de A o A1 de SLT-1

[0063] La diversidad de la biblioteca representa un parámetro crucial en el cribado de bibliotecas combinatorias para ligandos capaces de unirse específicamente y con alta afinidad a una diana particular. La biblioteca de tripéptidos de cadena A de SLT-1 descrita en los ejemplos 1 ó 4 y las bibliotecas de tripéptidos de cadena A1 de SLT-1 descritas en los ejemplos 2, 3, 5 y 6 tienen una diversidad máxima de 20^3 u 8000 posibles cadenas A mutadas. Este repertorio de muestreo es pequeño, pero fue útil para el mapeo de un epítipo de tripéptido para establecer nuestra prueba de concepto. Una biblioteca de siete residuos (20^7 o $1,3 \times 10^9$ posibles mutantes) representa un nivel de diversidad mínimo más típico utilizado habitualmente en el diseño de bibliotecas de expresión en fagos, así como bibliotecas de péptidos sintéticos. De este modo, como punto de partida, se construyen bibliotecas de A y A1 de SLT-1 (tal como se describe en los ejemplos 1-6) con una secuencia aleatoria de 7 aminoácidos de largo insertada en su C-terminal (figuras 4A-H). Cada una de estas bibliotecas proporciona una diversidad suficiente para asegurar que se pueden identificar las variantes de toxina de cadena A o cadena A1 que reconocen receptores interiorizados nuevos o conocidos en células cancerosas. Todos los elementos de cada una de estas bibliotecas (así como de otras bibliotecas propuestas) contienen una etiqueta de His N-terminal para purificar rápidamente mutantes de la cadena A. Las bibliotecas (figuras 4A-4H) se generan usando una estrategia de PCR megacebador (Sarkar G, y Sommers S, (1990). The 'megaprimer' method of site-directed mutagenesis. *Biotechniques* 8, 404-407). La estrategia de megacebadores se utiliza ampliamente para introducir mutaciones en la secuencia de ADN diana mediante dos rondas de PCR que usan dos cebadores flanqueantes y un cebador mutagénico interno.

[0064] Se fabrican todas las bibliotecas de heptapéptidos de cadena A y las bibliotecas de heptapéptidos de cadena A1 de la siguiente manera. Las bibliotecas de heptapéptidos de cadena A de SLT-1 (figuras 4A-4H) albergan una inserción aleatoria de 7 aminoácidos entre los aminoácidos 245 y 246 de la cadena A o A1, el sitio idéntico usado para construir la biblioteca de tripéptidos de cadena A de SLT-1 de la invención (Tablas 1, 2, figura 3). Brevemente, la construcción de las bibliotecas de heptapéptidos de cadena A se describe de la siguiente manera usando como ejemplo una cadena A que contiene 2 cisteínas. La construcción de las bibliotecas de heptapéptidos de cadena A1 se lleva a cabo usando procedimientos similares, con las modificaciones necesarias para formar una cadena de A1 (y tal como se describe en los Ejemplos paralelos 2, 3, 5 y 6, más arriba).

[0065] Se hibridaron dos cebadores flanqueantes A (GTT ACT GTG GCT GAA ACA GCT TTA CGT TTT CG (Seq.ID N° 2) y B (GAG AAG AAG AGA CTG CAG TCA CCA TCT GTT G (Seq. ID N°3)) que llevan los sitios de restricción Hind 111 y Pst1, respectivamente, en los extremos 5' y 3' del operón de SLT-1. Se sintetizaron un oligonucleótido de la biblioteca F que contenía los siete aminoácidos aleatorios (NNS), así como una secuencia de emparejamiento larga para hibridarse a la plantilla. En la síntesis del oligonucleótido aleatorio, la representación relativa de cada aminoácido se mejoró restringiendo la tercera posición de cada codón a G o T (Noren, KA, y Noren, CJ (2001) Construction of high-complexity combinatorial phage display peptide libraries. *Methods* 23, 169-178.). Este tipo de restricción reduce la complejidad de la secuencia de ADN global, así como la discrepancia de codificación entre los residuos (Reidhaar-Olson, et al. (1991) Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotide cassettes. *Methods Enzymol* 208, 564-586). Esta estrategia minimiza también la aparición de codones de terminación (TAA y

TGA), mientras que el codón de parada (TAG) se suprime mediante el uso de una cepa bacteriana supE, que es específica para la inserción de un residuo Gln cuando se traducen codones TAG. La primera reacción de PCR se realizó usando los cebadores A y F y el producto resultante se purificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante. Este producto a continuación sirvió como megacebador con el cebador B para una segunda reacción de PCR para amplificar el ADN aleatorio. El ADN de la biblioteca final (producto de PCR) se digirió a continuación con Hind 111 y Pst1 y se clonó en el esqueleto de un vector de expresión pECHE9a (MTI, Toronto). La cepa de *E. coli* JM101 se transformó posteriormente con el vector PECHE resultante y se recogieron colonias bacterianas individuales, se lisaron y sus sobrenadantes se analizaron para la expresión de toxinas de cadena A individuales o en capas sobre células cancerosas y se cribaron usando el SRB para el ensayo de citotoxicidad de las células.

Ejemplo 8

Producción de la biblioteca combinatoria de heptapéptidos de A de SLT-1 contra líneas de células de cáncer utilizando un ensayo de citotoxicidad

[0066] Se criban nuestras bibliotecas de heptapéptidos de A de SLT-1 y nuestras bibliotecas de heptapéptidos de A1 de SLT-1 utilizando la función citotóxica de la cadena A o A1 como señal reportera. La citotoxicidad es una propiedad más informativa para medir que la unión a un receptor, ya que implica que la toxina se internaliza, se procesa y se libera cerca de los ribosomas, claramente un evento de múltiples etapas. El ensayo de citotoxicidad se realiza esencialmente tal como se ha descrito previamente (Bray, et al. (2001) Probing the surface of eukaryotic cells using combinatorial toxin libraries. *Current Biology* 11, 697-701). Brevemente, la estrategia para cribar todas nuestras bibliotecas de cadena A se basa en los siguientes principios. Se desarrollan líneas celulares de cáncer establecidas, tales como SK-BR-3 (mama humano), CAMA-1 (mama humano), 518A2 (melanoma humano), PC3 (próstata humana) y B16 (melanoma murino) en placas de 96 pocillos y se utilizan como dianas en las etapas de cribado primario. Estas líneas celulares se seleccionan inicialmente para nuestras búsquedas de la biblioteca de holotoxinas (Bray, supra) basándose en su adherencia (plástico), sus propiedades de tinción de la viabilidad celular (SRB) en una configuración de cribado de alto rendimiento, así como su falta de receptor y sensibilidad a la SLT-1 nativa (para asegurar un nivel reducido de falsos positivos). Se recogen colonias bacterianas individuales de cada biblioteca y se desarrollan en placas de 96 pocillos profundos. Las células se recogen, lisan, y se aclaran sus lisados. Dado que toda las variantes de la cadena A o las variantes de la cadena de A1 de SLT-1 expresadas tienen una etiqueta de histidina en su extremo N-terminal, cada uno de ellos se purifica a partir de su lisado usando partículas de afinidad a níquel (formato de 96 pocillos) y en capas sobre células diana. Las placas que contienen las células diana tratadas con variantes de la cadena A o variantes de la cadena A1 se incuban a continuación a 37°C durante 48 horas, seguido por la fijación y tinción con Sulforodamina B (SRB). El ensayo con SRB es un ensayo de punto final colorimétrico que cuantifica las células viables mediante tinción de su contenido de proteína celular (Skehan, et al (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82, 1107-1112.). El ensayo con SRB ha sido adoptado por el NCI/NIH por su cribado de alto rendimiento de candidatos de fármacos en las líneas celulares de cáncer. Los ensayos de viabilidad se repiten para cualquier extracto bacteriano que conduce a la muerte celular. Se realiza una primera ronda de cribado en más de 5000 clones bacterianos (equivalentes a 5000 toxinas de cadena A distintas) para cada una de las bibliotecas de pentapéptidos de cadena A y cadena A1 tal como se describe en las figuras 4A a 4H, y se identifican varias variantes de toxina en cada biblioteca como eliminadores repetibles de la línea celular de melanoma humano 518A2 (figura 5). Se observa que las bibliotecas de la cadena A1 de figuras 4F, 4G y 4H tienen propiedades citotóxicas similares a las de las bibliotecas de la cadena A. También se observa que las bibliotecas con las mutaciones en la cisteína 242 o la cisteína 261, o en ambas cisteínas, tal como se describe en las figuras 4B, 4C, 4D y 4E, también tienen propiedades citotóxicas similares a las de la biblioteca de la cadena A de "tipo salvaje" de la figura 4A.

[0067] El eje de abscisas representa el logaritmo de la concentración de toxina usada para tratar las células y el eje de ordenadas representa el porcentaje observado de células que son viables después de 48 horas. Los triángulos rellenos representan el efecto de la toxina de tipo salvaje en células 518A2, mientras que las dos variantes de cadena A más eficaces se denominaron SAM # 3 (cuadrados blancos) y SAM # 5 (símbolos X).

[0068] Las variantes de cadena A y cadena A1 prometedoras de cada una de las bibliotecas de heptapéptidos a continuación se vuelven a cribar frente a un panel de líneas celulares (Vero [Mono, riñón normal]; PC-3 [Humano, cáncer de próstata]; HepG2 [Humano, hepatoma]; SiHa [Humano, cáncer cervical]; PANC [Humano, cáncer pancreático]; SKBR-3 [Humano, cáncer de mama]; 518-A2 [Humano, melanoma]; U87 [Humana, glioma]; B16-F10 [Ratón, melanoma]; HS-216 [humano, fibroblastos normales]; CAMA-1 [Humano, cáncer de mama]; OVCAR-3 [Humano, cáncer de ovario]). De estas variantes, se observa que una proporción significativa tiene actividad frente a cada una de las líneas celulares de cáncer, el melanoma humano 518-A2, y las líneas celulares SiHa (células de cáncer cervical humano) y U87-A (células de cáncer de cerebro humano; glioma) .

[0069] Se secuenciaron los genes que codifican para las dos toxinas de cadena A (SAM3 y SAM5) que dieron como resultado la toxicidad de las líneas celulares de melanoma humano para determinar las secuencias de aminoácidos insertadas entre los residuos 245 y 246 de la cadena A de tipo salvaje. Las secuencias, incluyendo la etiqueta de His, se enumeran en la Seq. ID N° 4 y 5, respectivamente.

Tabla 1: secuencias de ADN de clones recogidos al azar de la biblioteca de tripéptidos de cadena A de SLT-1. Las bases mutadas en negrita. El mutante # 41 fue identificado en el cribado con ELISA como una fuerte enlazador del mAb Onc M27 (figura 3).

5

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

Tabla 2: Alineación de la secuencia de aminoácidos de clones seleccionados al azar de la biblioteca de tripéptidos de cadena A de SLT-1 y señal de ELISA de las variantes de cadena A de SLT-1 purificadas detectada con un mAb (Onc M27) producido contra el epítipo MUC1 Thr-Arg-Pro. La región de tripéptido mutada en negrita. El mutante # 41 fue identificado en el cribado con ELISA como una fuerte enlazador del mAb Onc M27.

10

Variante de la secuencia de nucleótidos deducida de la cadena A de SLT-1	lecturas de ELISA (405 nm)	
Epítipo MUC1	CHHHPD TRP APASRVARMASDEFPSMC	1,3
Mutante # 1	CHHHPD GIG APASRVARMASDEFPSMC	0,08
Mutante # 2	CHHHPD LQM APASRVARMASDEFPSMC	0,03
Mutante # 3	CHHHPD PRG APASRVARMASDEFPSMC	0,03
Mutante # 4	CHHHPD DDL APASRVARMASDEFPSMC	0,06
Mutante # 5	CHHHPD VRW APASRVARMASDEFPSMC	0,07
Mutante # 6	CHHHPD QRL APASRVARMASDEFPSMC	0,06
Mutante # 7	CHHHPD LRM APASRVARMASDEFPSMC	0,11
Mutante # 8	CHHHPD SQE APASRVARMASDEFPSMC	0,13
Mutante # 9	CHHHPD SDP APASRVARMASDEFPSMC	0,07
Mutante # 41	CHHHPD TRP APASRVARMASDEFPSMC	1,25

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Biblioteca combinatoria de proteínas que comprende una pluralidad de especies de proteínas, comprendiendo cada especie de proteína una cadena A de una proteína de toxina I del tipo Shiga modificada mediante la mutación del aminoácido Cys242 y/o Cys261 de la secuencia mostrada en la figura 14A, figura 14C o figura 15A, comprendiendo la cadena A modificada además un bucle sensible a proteasa tal como se define con referencia a los aminoácidos 242 a 261 de la secuencia mostrada en la figura 14A, figura 14C o figura 15A, en la que se ha introducido un inserto, comprendiendo el inserto un polipéptido de una secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 3 a 200 residuos de aminoácidos.
- 10 2. Biblioteca combinatoria de proteínas, según la reivindicación 1, en la que la cadena A modificada comprende un residuo de cisteína y comprende además un marcador o sonda unidos al residuo de cisteína.
- 15 3. Biblioteca combinatoria de proteínas, según la reivindicación 1 ó 2, en la que la mutación en al menos una cisteína es una mutación de cisteína a una alanina.
- 20 4. Biblioteca combinatoria de proteínas, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la especie de proteína se forma mediante la introducción de un inserto entre los aminoácidos 245 y 246, tal como se define con referencia a la secuencia mostrada en la figura 14A, figura 14C o figura 15A.
- 25 5. Biblioteca combinatoria de proteínas, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el inserto tiene una longitud de 7 aminoácidos.
- 30 6. Proteína mutante que comprende una cadena A de una proteína de toxina I del tipo Shiga modificada mediante la mutación del aminoácido Cys242 y/o Cys261 de la secuencia mostrada en la figura 14A, figura 14C o figura 15A, comprendiendo la cadena A modificada además un bucle sensible a proteasa tal como se define con referencia a los aminoácidos 242 a 261 de la secuencia mostrada en la figura 14A, figura 14C o figura 15A, en la que se ha introducido un inserto, comprendiendo el inserto un polipéptido de una secuencia de aminoácidos variante que tiene una longitud de 3 a 200 residuos de aminoácidos.
- 35 7. Proteína mutante, según la reivindicación 6, en la que la mutación en al menos una cisteína es una mutación de cisteína a una alanina.
8. Proteína mutante, según la reivindicación 6, en la que el inserto se introduce entre los aminoácidos 245 y 246, tal como se define con referencia a la secuencia mostrada en la figura 14A, figura 14C o figura 15A.
9. Proteína mutante, según la reivindicación 8, en la que el inserto comprende la secuencia IYSNKLM.
- 40 10. Proteína mutante, según la reivindicación 8, en la que el inserto comprende la secuencia AAFADLI.
- 45 11. Procedimiento para aislar una toxina específica para una diana/receptor, que comprende las etapas de:
 (a) exponer la diana/receptor a una biblioteca combinatoria de proteínas, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
 (b) aislar al menos una especie de proteína de la biblioteca combinatoria de proteínas capturada mediante la unión a la diana/receptor.
- 50 12. Procedimiento, según la reivindicación 11, que comprende además la etapa de cribar la proteína aislada frente a células que expresan la diana/receptor, para confirmar su toxicidad para células que expresan la diana/receptor.
- 55 13. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que la diana/receptor es una diana/receptor purificado y está inmovilizado sobre un soporte sólido.
14. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que la diana/receptor está sobre la superficie de las células.
15. Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que las células están inmovilizadas sobre un soporte sólido.
- 60 16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que la toxina sirve como reportera, y la muerte de las células es indicativa de la unión a un receptor.
- 65 17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que las células son células cancerosas.
18. Biblioteca combinatoria de proteínas, según la reivindicación 2, en la que la cadena A modificada es una cadena A modificada de la toxina I del tipo Shiga, y en la que los marcadores o sondas se seleccionan del grupo que consiste en marcadores o sondas espectroscópicas, radioactivas y bioquímicas.
19. Biblioteca combinatoria de proteínas que comprende una pluralidad de especies de proteínas, comprendiendo

5 cada especie de proteína una cadena A de una proteína de toxina I del tipo Shiga modificada mediante la mutación del aminoácido Cys242 y/o Cys261 de la secuencia mostrada en la figura 14A, figura 14C o figura 15A, comprendiendo la cadena A modificada además un bucle sensible a proteasa tal como se define con referencia a los aminoácidos 242 a 261 de la secuencia mostrada en la figura 14A, figura 14C o figura 15A, en la que se ha introducido un inserto, consistiendo el inserto en una secuencia de dominio variable de una molécula Fc.

Fig. 1

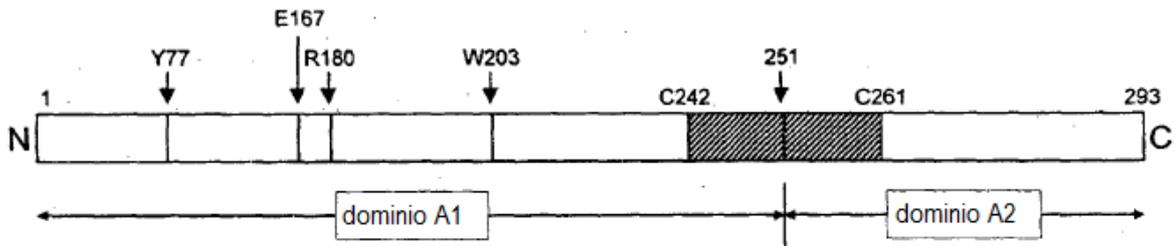


Fig. 2A

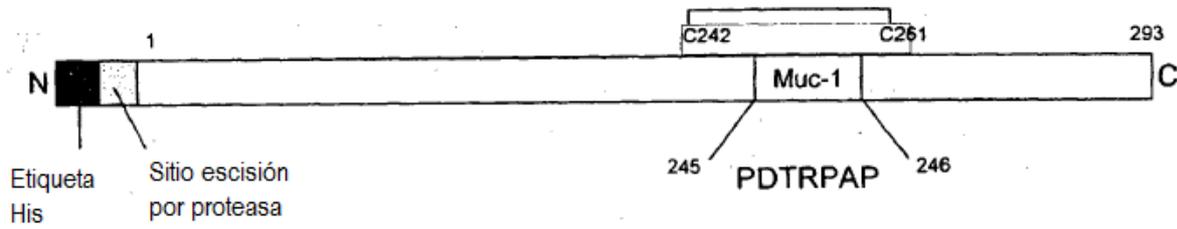


Fig. 2B

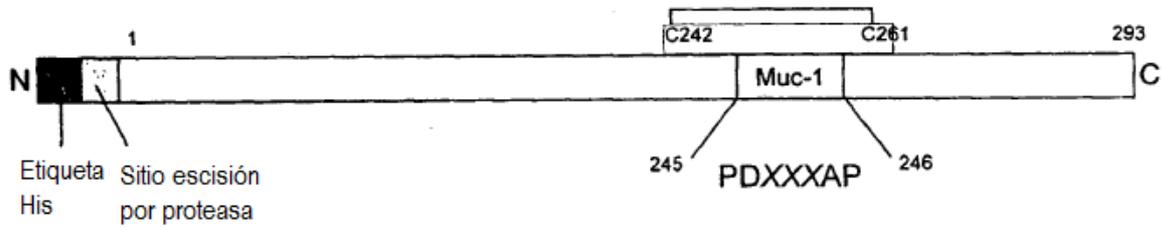


Fig. 2C

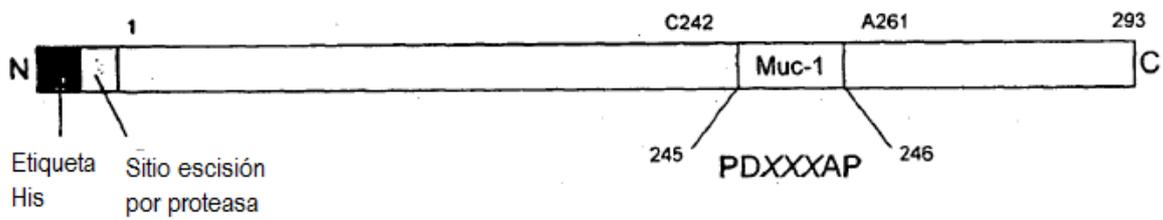


Fig. 2D

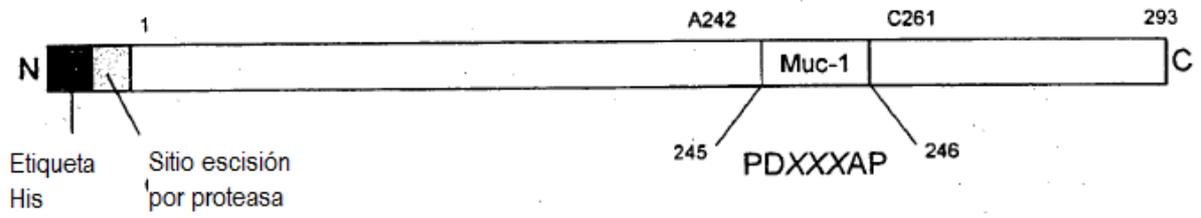


Fig. 2E

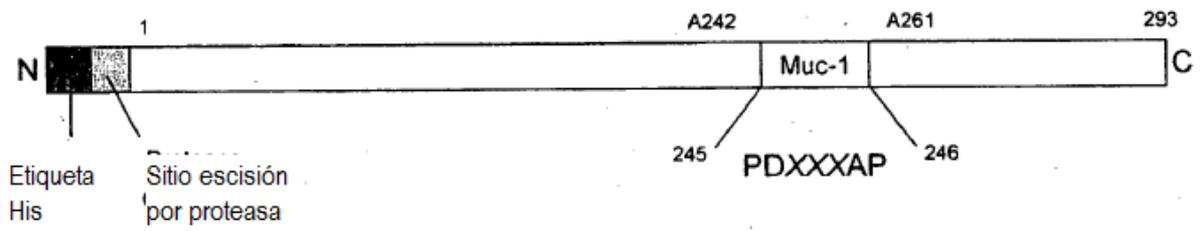


Fig. 2F

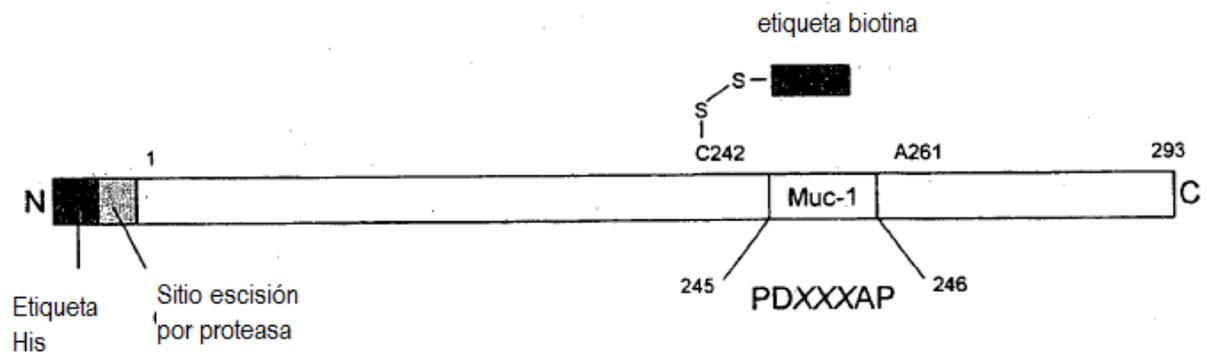


Fig. 2G

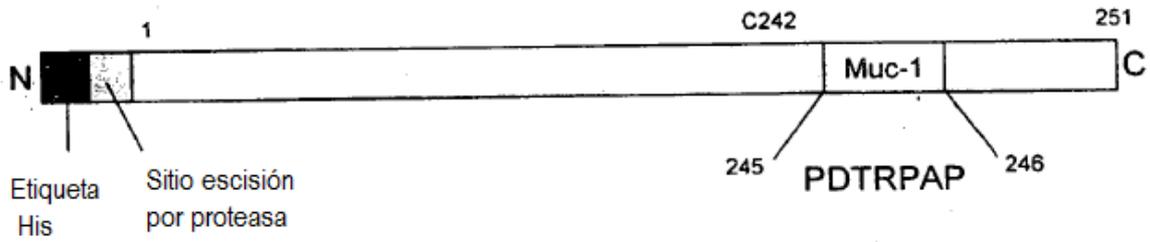


Fig. 2H

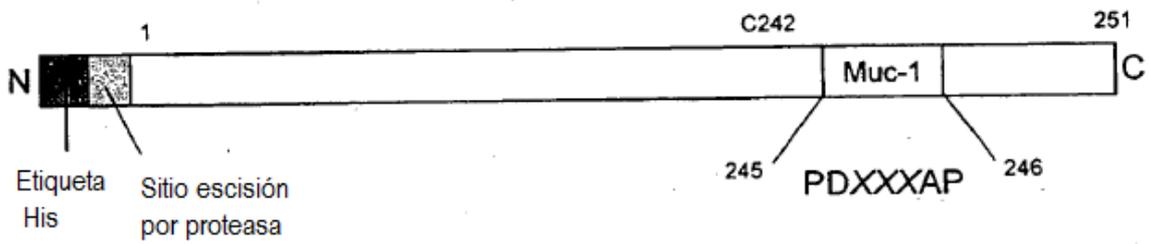


Fig. 2I

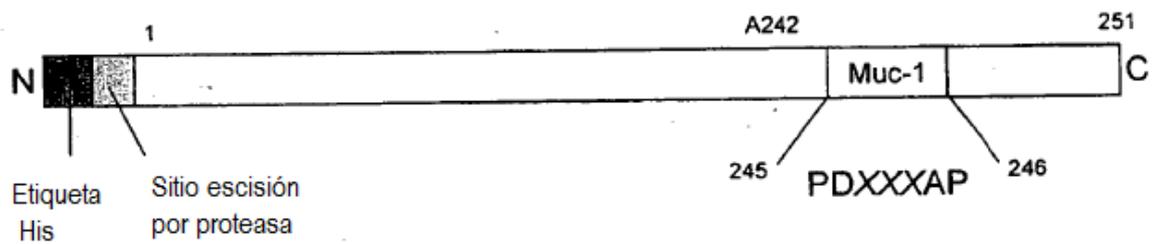
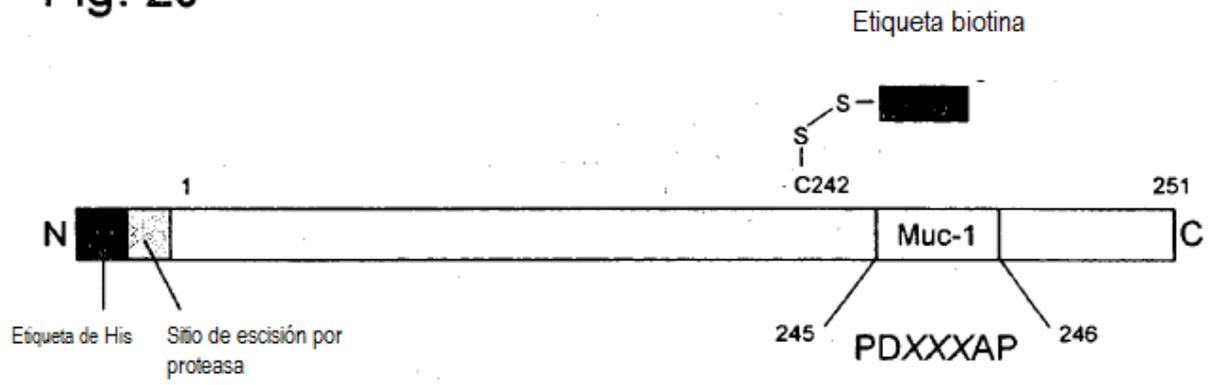


Fig. 2J



Grupos de datos de ELISA representativos del cribado de 96 variantes de toxinas distintas

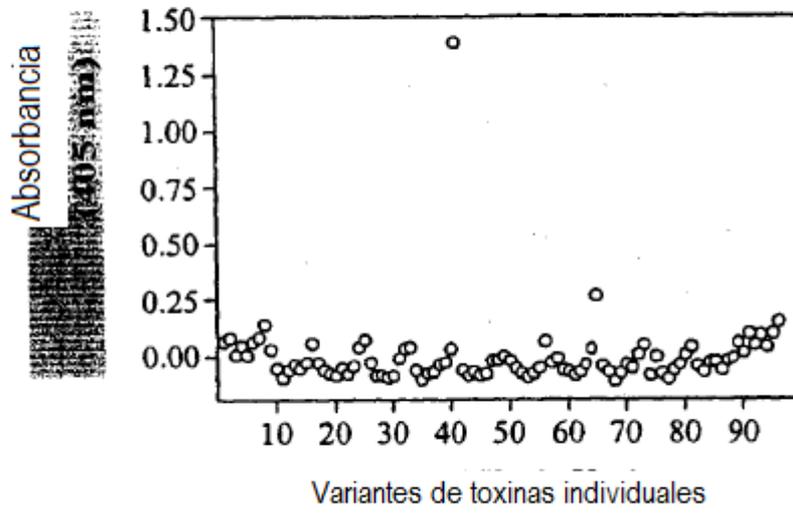


Fig. 3

Fig. 4A

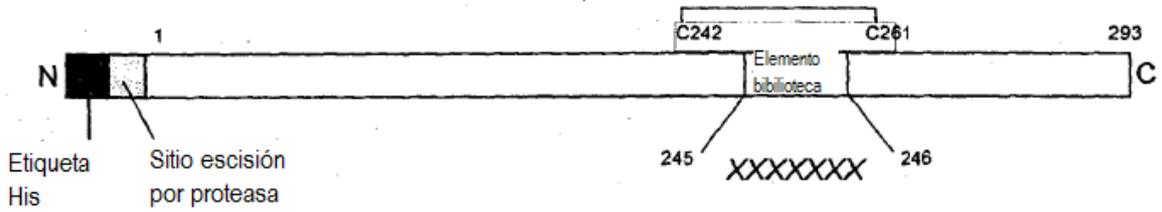


Fig. 4B

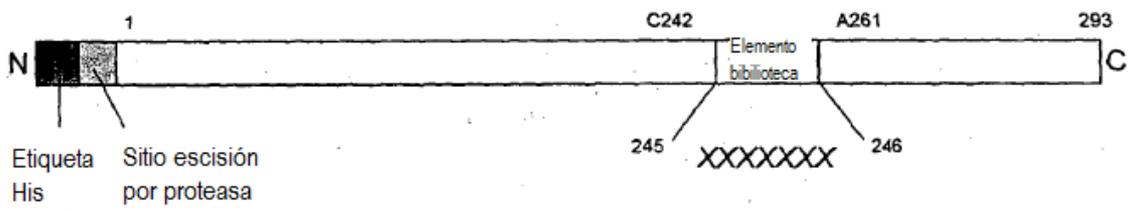


Fig. 4C

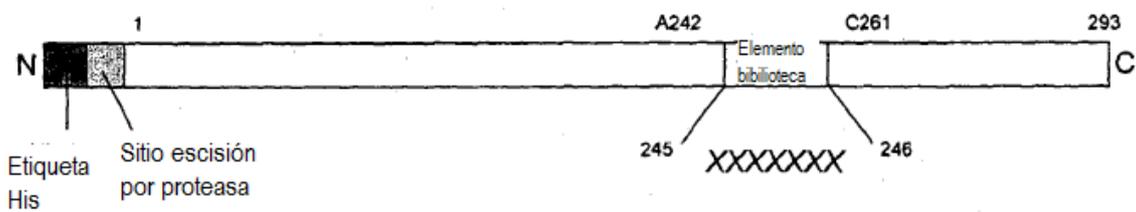


Fig. 4D

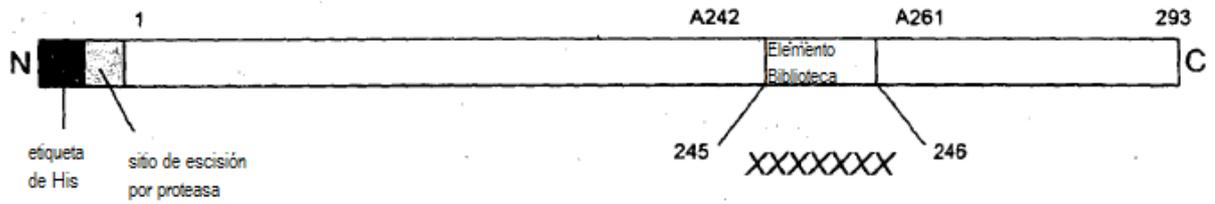


Fig. 4E

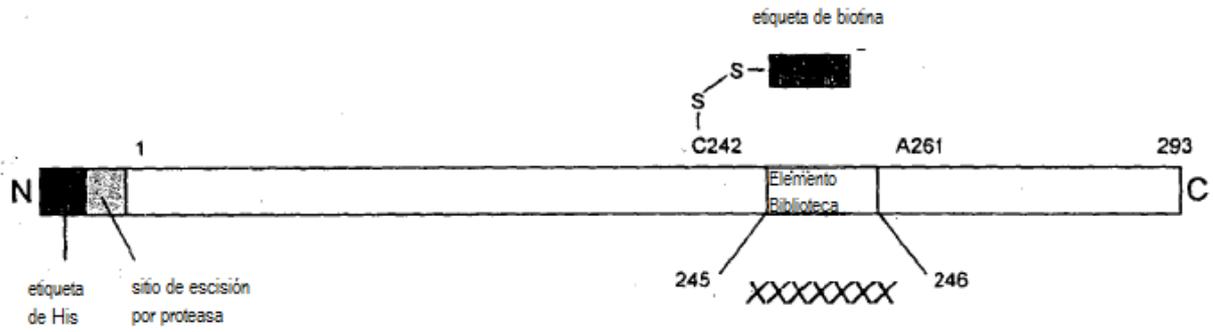


Fig. 4F

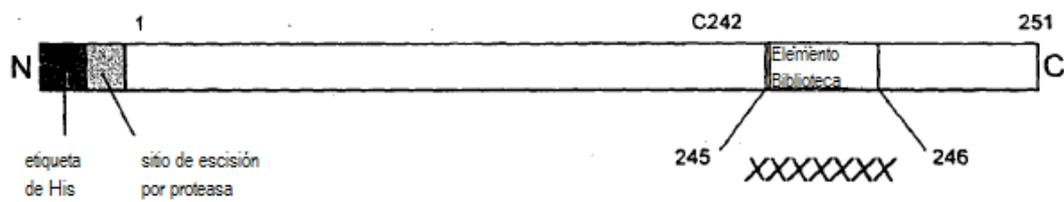


Fig. 4G

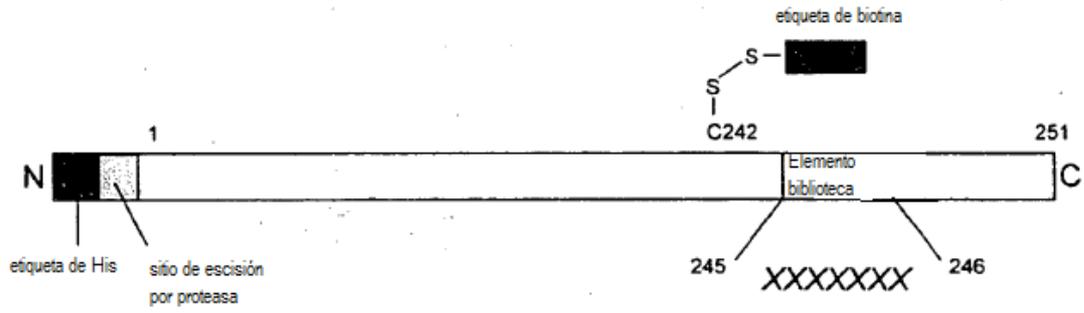


Fig. 4H

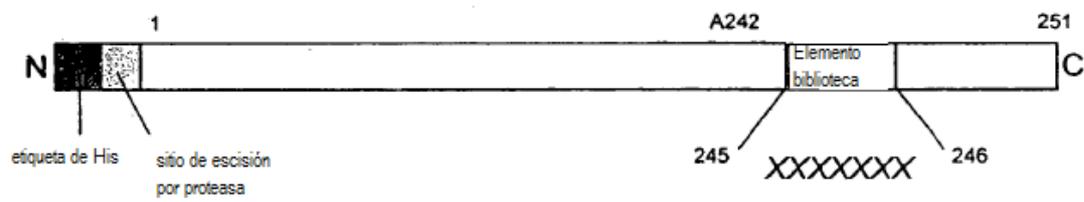


Figura 5

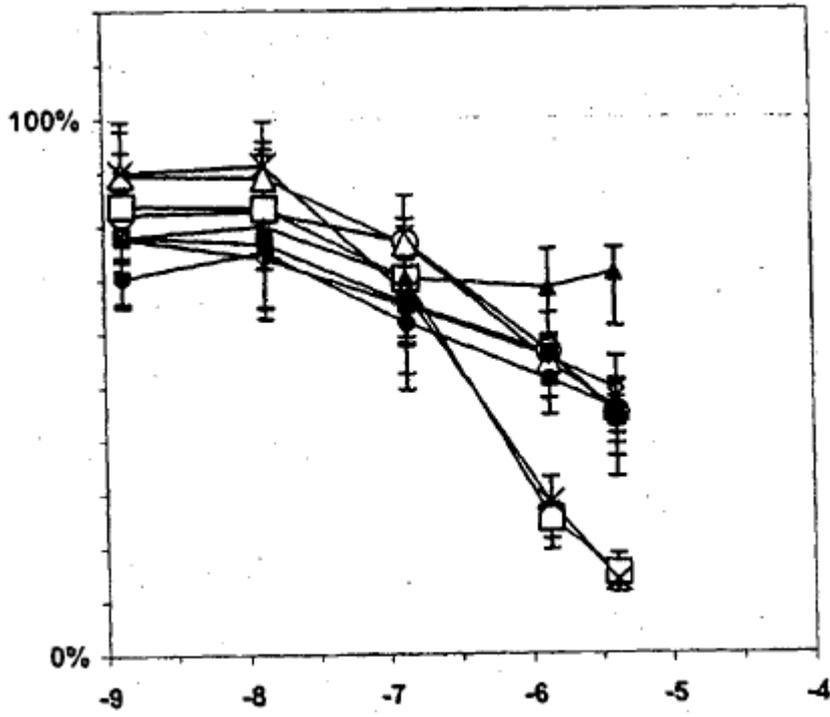


Figura 6

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQGFRT
TLDDLSGRSYVM TAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NCHHHSRVARMASDEFPSMCPADGRVGRITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

Figura 7

7A:

Secuencia para la figura 2A menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NCHHHPDTRPAPASRVARMASDEFPSMCPADGRVIRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

7B:

Secuencia para la figura 2A incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID
DSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTSLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNCHHHPDTRPAPASRVARMASDEFPSMCPADGRVIRGITHNK
ILWDSSTLGAILMRRTISS

7C:

Secuencia para la figura 2B menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NCHHHPDXXXAPASRVARMASDEFPSMCPADGRVIRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

7D:

Secuencia para la figura 2B incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID
DSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTSLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNCHHHPDXXXAPASRVARMASDEFPSMCPADGRVIRGITHNK
ILWDSSTLGAILMRRTISS

Figura 8

8A:

Secuencia para las figuras 2C y 2F menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
 EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
 AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
 TLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
 NCHHPDXXXAPASRVARMASDEFPSMAPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

8B:

Secuencia para las figuras 2C y 2F incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI
 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
 GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
 VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
 GRISFGSINAILGSVALILNCHHPDXXXAPASRVARMASDEFPSMAPADGRVRGITHNK
 ILWDSSTLGAILMRRTISS

8C:

Secuencia para la figura 2D menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
 EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
 AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
 TLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
 NAHHHPDXXXAPASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

8D:

Secuencia para la figura 2D incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI
 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
 GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
 VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
 GRISFGSINAILGSVALILNAHHHPDXXXAPASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITHNK
 ILWDSSTLGAILMRRTISS

Figura 9

9A:

Secuencia para la figura 2E menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
 EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLGDSSYTTLQRV
 AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
 TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
 NAHHHPDXXXAPASRVARMASDEFPSMAPADGRVIRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

9B:

Secuencia para la figura 2E incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI
 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
 GTTAVTSLGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
 VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
 GRISFGSINAILGSVALILNAHHHPDXXXAPASRVARMASDEFPSMAPADGRVIRGITHNK
 ILWDSSTLGAILMRRTISS

9C:

Secuencia para la figura 2G menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
 EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLGDSSYTTLQRV
 AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
 TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
 NCHHPDTRPAPASRVAR

9D:

Secuencia para la figura 2G incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI
 DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
 GTTAVTSLGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
 VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
 GRISFGSINAILGSVALILNCHHPDTRPAPASRVAR

Figura 10

10A:

Secuencia para las figuras 2H y 2J menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NCHHHPDXXXAPASRVAR

10B:

Secuencia para las figuras 2H y 2J incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI
DSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNCHHHPDXXXAPASRVAR

10C:

Secuencia para la figura 2I menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NAHHPDXXXAPASRVAR

10D:

Secuencia para la figura 2I incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI
DSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNAHHPDXXXAPASRVAR

Figura 11

11A

Secuencia para la figura 4A menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NCHHHXXXXXXXXXASRVARMASDEFPSMCPADGRVIRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

11B

Secuencia para la figura 4A incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI
DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNCHHHXXXXXXXXXASRVARMASDEFPSMCPADGRVIRGITHNK
ILWDSSTLGAILMRRTISS

11C

Secuencia para las figuras 4B y 4E menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NCHHHXXXXXXXXXASRVARMASDEFPSMAPADGRVIRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

11D

Secuencia para las figuras 4B y 4E incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI
DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNCHHHXXXXXXXXXASRVARMASDEFPSMAPADGRVIRGITHNK
ILWDSSTLGAILMRRTISS

Figura 12

12A

Secuencia para la figura 4C menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NAHHHXXXXXXXXXASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

12B

Secuencia para la figura 4C incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI
DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNAHHHXXXXXXXXXASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITHNK
ILWDSSTLGAILMRRTISS

12C

Secuencia para la figura 4D menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NAHHHXXXXXXXXXASRVARMASDEFPSMAPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

12D

Secuencia para la figura 4D incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI
DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNAHHHXXXXXXXXXASRVARMASDEFPSMAPADGRVRGITHNK
ILWDSSTLGAILMRRTISS

Figura 13
13A

Secuencia para las figuras 4F y 4G menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NCHHHXXXXXXXXXASRVAR

13B

Secuencia para las figuras 4F y 4G incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNCHHHXXXXXXXXXASRVAR

13C

Secuencia para la figura 4H menos la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NAHHHXXXXXXXXXASRVAR

13D

Secuencia para la figura 4H incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDL SGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNAHHHXXXXXXXXXASRVAR

Figura 14

14A

Secuencia de la región A de tipo salvaje con C261A

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
 EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLDSSYTTLQRV
 AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
 TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
 NCHHHASRVARMASDEFPSMAPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

14B

Secuencia para la región A con C261A e incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID
 DSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
 GTTAVTSLDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
 VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
 GRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVARMASDEFPSMAPADGRVRGITHNKILWDSST
 LGAILMRRTISS

14C

Secuencia para la región A de tipo salvaje con C242A

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
 EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLDSSYTTLQRV
 AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
 TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
 NAHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

14D

Secuencia para la región A con C242A e incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID
 DSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
 GTTAVTSLDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
 VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
 GRISFGSINAILGSVALILNAHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVRGITHNKILWDSST
 LGAILMRRTISS

Figura 15

15A

Secuencia para la región A con C242A, C261A

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
 EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLGDSSTTLQRV
 AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
 TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
 NAHHASRVARMASDEFPSMAPADGRVIRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

15B

Secuencia para la región A con C242A, C261A, e incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLGDSSTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNAHHASRVARMASDEFPSMAPADGRVIRGITHNKILWDSSTLGAILMRRTISS

15C

Secuencia para la región A1

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPE
 EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLGDSSTTLQRV
 AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
 TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
 NCHHASRVAR

15D

Secuencia para la región A1incluyendo la región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLGDSSTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHASRVAR

Figura 16
16A

Secuencia para la región A1 con C242A

KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE
EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV
AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRT
TLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALIL
NAHHASRVAR

16B

Secuencia para la región A1 con C242A e incluyendo región sensible a proteasa con etiqueta de His

KGMRSHHHHHHHHIEGRASKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI
DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP
GTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF
VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV
GRISFGSINAILGSVALILNAHHASRVAR