

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 944**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00	(2006.01) C07K 16/08	(2006.01)
C07K 14/245	(2006.01)	
C12N 15/62	(2006.01)	
C12N 15/63	(2006.01)	
C12N 15/31	(2006.01)	
A61K 38/16	(2006.01)	
A61K 39/395	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
A61K 39/00	(2006.01)	
C07K 14/005	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2010** **PCT/CN2010/070762**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011** **WO11072501**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010** **E 10836940 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 2514768**

54 Título: **Polipéptido de fusión frente a un tumor inducido por el virus de EB y un mutante de la colicina la**

30 Prioridad:

17.12.2009 CN 200910242838

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2017

73 Titular/es:

PROTEIN DESIGN LAB, LTD. (100.0%)
East 1000 Meters Qianshajian, Sujiatuo, Haidian
District
Beijing 100095, CN

72 Inventor/es:

QIU, XIAOQING

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 634 944 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

Polipéptido de fusión frente a un tumor inducido por el virus de EB y un mutante de la colicina la

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de los agentes antitumorales y, de forma más concreta, a un polipéptido nuevo frente a un tumor provocado por el virus de EB, y al uso y un método de preparación del mismo.

10 Técnica relacionada

En el área de la investigación sobre antibióticos, se han dirigido los estudios hacia el desarrollo de nuevos antibióticos que estimulan las mecanismos de interdestrucción entre cepas heterólogas homogéneas. Existen muchas toxinas bacterianas en la naturaleza, las cuales destruyen células mediante la formación de canales iónicos directamente en la membrana de las bacterias. El modelo ejemplar de tales toxinas es la colicina, una toxina bacteriana que secreta *E. coli*. En 1952 Jacob descubrió la colicina la, desde entonces, a través del duro trabajo de generaciones, Qiu *et al.* (Major transmembrane movement associated with colicin la channel gating. J. Gen. Physiology, 107:313-328 (1996)) reveló finalmente la estructura espacial transmembrana de la colicina la cuando los canales iónicos formados en membranas de bicapa lipídica artificiales están cerrados o abiertos, lo que proporciona una base fundamental para el diseño y la preparación de antibióticos nuevos a nivel molecular. Con posterioridad, hay moléculas polipeptídicas fabricadas mediante la conexión del polipéptido de la colicina con un péptido señal, tal como las feromonas de *Streptococcus albus* o *Staphylococcus*, que dirigen a la colicina a la membrana celular de la bacteria de interés y destruyen la célula debido a la filtración de contenidos celulares a través de los canales iónicos transmembrana formados.

Los tumores malignos representan una gran amenaza para la salud humana. Cada año fallecen en el mundo siete millones de personas por tumores malignos, de los que la sexta parte se producen en China. Los tumores malignos son actualmente la segunda causa principal de muerte en el país. Dado que la etiología, la patogenia y las manifestaciones clínicas de un tumor maligno no están claramente dilucidadas, la prevención y el tratamiento no son eficaces. Los agentes antitumorales son importantes en el tratamiento de un tumor. Aunque logran efecto terapéutico en algunos tumores, sigue habiendo algunas desventajas, tales como una selectividad tumoral insuficiente, supresión inmunitaria, reacciones adversas, resistencia a fármacos, etc.

La superficie de las células de linfoma de Burkitt, de linfoma de Hodgkin y de carcinoma nasofaríngeo provocado por el virus de Epstein-Barr (EB), porta un antígeno de superficie específico del virus de EB. Por lo tanto, el antígeno de superficie del virus de EB puede considerarse como un marcador de superficie de tales células tumorales. Para los agentes frente al tumor provocado por el virus de EB, la invención con el N.º de patente china ZL200410081446.8 divulga un polipéptido antitumoral formado por la conjugación de la colicina y el mimético de anticuerpo que reconoce el antígeno de superficie del virus de EB. El polipéptido antitumoral puede destruir de forma específica en el cuerpo las células cancerosas provocadas por el virus de EB, no provoca daño a las células normales, su capacidad de destrucción es varias veces superior a la de otros agentes tumorales y supera los problemas tales como la selectividad tumoral, resistencia a fármacos, deterioro del tejido normal cuando se matan las células cancerosas. Xiao-Qing Qiu *et al.* (Xiao-Qing Qiu *et al.*, 2007, Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting, Nature Biotechnology 25, 921-929, 1 de agosto de 2007), compara el efecto destructor de los polipéptidos antitumorales contruidos mediante una serie de anticuerpos miméticos y la colicina, y descubre que los polipéptidos antitumorales contruidos mediante un mimético de anticuerpo de VHCDR1-VHFR₂-VLCDR3 y VLCDR1-VHFR₂-VHCDR3 con la colicina tienen una capacidad de destrucción superior. Este trabajo proporciona más miméticos de anticuerpo candidatos para la preparación de polipéptidos frente al tumor provocado por el virus de EB.

El documento WO 2007/083175 divulga una construcción que comprende el mimético de anticuerpo de la presente solicitud conjugado a una colicina la de tipo silvestre utilizada para el tratamiento del cáncer. Los documentos US 2006/233813 y US 2006/193867 describen la misma construcción que el documento WO 2007/083175 y su uso en el tratamiento del cáncer inducido por el VEB.

Sin embargo, para el polipéptido antitumoral descrito anteriormente, dado que el extremo terminal hidrófobo de la colicina tiene algunos restos de aminoácidos que pueden incluir hipersensibilidad, es posible que los medicamentos que comprenden polipéptidos de la colicina produzcan más fácilmente respuestas inmunitarias anómalas *in vivo*. Se ha descrito que el mecanismo metabólico de muchos pacientes con cáncer es anómalo debido a la alteración de las células cancerosas, es fácil que padezcan una respuesta alérgica frente al medicamento de polipéptidos y, por lo tanto, no puedan tratarse con tal medicamento. Por lo tanto, es necesario mejorar el polipéptido de colicina para obtener un medicamento anticanceroso que sea seguro y adecuado para más pacientes.

Sumario de la invención

A base de la desventaja de la técnica anterior indicada anteriormente, la presente invención proporciona un polipéptido nuevo frente a un tumor provocado por el virus de EB, y el uso y método de preparación del mismo, por lo tanto, proporciona un medicamento para el tratamiento de un tumor provocado por el virus de EB que tiene alta capacidad de destrucción, alta especificidad y una baja posibilidad de alergia, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB, que está formado por la unión operativa de un polipéptido mutante de la colicina que puede formar canales iónicos, con un polipéptido de un anticuerpo anti virus de EB o un polipéptido de un mimético de anticuerpo anti virus de EB, en el que el polipéptido mutante de la colicina que puede formar canales iónicos se obtiene mediante la mutación de los restos de aminoácido G11A, H22G, A26G, V31L y H40D, en la cadena peptídica de la colicina la de tipo silvestre, la secuencia de aminoácidos del polipéptido del anticuerpo anti virus de EB es la misma que la del polipéptido del anticuerpo monoclonal que secreta el hibridoma HB-168 de la ATCC y en el que el polipéptido del mimético de anticuerpo es un péptido conectado de la región CDR1 de la cadena pesada, que une el segmento peptídico de las CDR1-CDR2 de la cadena pesada y la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo anti virus de EB que secreta el hibridoma HB-168 de la ATCC.

El polipéptido mutante de la colicina que puede formar canales iónicos se obtiene mediante la mutación de la colicina la de tipo silvestre.

El polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 29.

Un gen que codifica el polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB.

El gen que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO. 30.

Un plásmido recombinante que comprende dicho gen.

Un método de preparación del polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB, que comprende las etapas de: transformar dicho plásmido recombinante en un sistema de expresión para la expresión y aislar el polipéptido expresado.

El uso de dicho polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención del tumor provocado por el virus de EB.

Un polipéptido mutante de la colicina la; su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO. 24.

Un gen que codifica un polipéptido mutante de la colicina la.

Uso de dicho gen en la preparación de un medicamento de péptido, uniendo operativamente dicho gen con un gen que expresa el péptido, clonando en un vector de expresión, transformando después el vector de expresión en un sistema de expresión y aislando el polipéptido expresado.

La invención proporciona un polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB, que está formado por un polipéptido mutante de la colicina que puede formar canales iónicos con un polipéptido de un anticuerpo anti virus de EB o un polipéptido de un mimético de anticuerpo anti virus de EB. Dado que hay algunos restos de aminoácido en el polipéptido de la colicina de tipo silvestre que pueden incluir hipersensibilidad, en la construcción de la molécula polipeptídica de la colicina que puede formar canales iónicos la invención muta de forma selectiva los restos de aminoácido de la región hidrófoba que pueden producir fácilmente una respuesta alérgica. Los sitios mutantes del polipéptido de la colicina la son: G11A, H22G, A26G, V31L y H40D. En ratones inmunizados con una inyección de un polipéptido de la colicina la o un polipéptido de la mutante, respectivamente, los datos experimentales muestran que el título del suero producido por los ratones a los que se les inyectó el polipéptido de la la mutante es varios órdenes de magnitud inferior que el primero, es decir, el nivel de la respuesta inmunitaria es inferior, lo que demuestra que el polipéptido mutante reduce la posibilidad de alergia, mientras conserva la función de formar canales iónicos en la membrana celular. El experimento demostró que la capacidad de destrucción del polipéptido recombinante de la invención no está afectada, lo que significa que los restos de aminoácido mutantes no afectan la función de la colicina de formar canales iónicos. En el polipéptido nuevo proporcionado por la invención frente al tumor provocado por el virus de EB, a través del reconocimiento de las células tumorales provocadas por el virus de EB por parte del polipéptido del anticuerpo anti virus de EB o del polipéptido del mimético de anticuerpo anti virus de EB, el polipéptido mutante de la colicina se dirige a la membrana celular de las células diana, la región hidrófoba del dominio transmembrana del canal iónico del polipéptido mutante de la colicina se inserta en la membrana celular de las células tumorales y forma un canal iónico, por lo tanto, las células tumorales mueren por la filtración de los contenidos celulares. La secuencia de aminoácidos del polipéptido del anticuerpo anti virus de EB se refiere

completamente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido del anticuerpo secretado por el hibridoma HB-168 de la ATCC.

En una realización de la invención, es preferente un polipéptido anti tumoral de bajo peso molecular de la invención, el cual se obtiene mediante la unión operativa del polipéptido del mimético de anticuerpo anti virus de EB descritos anteriormente, con el extremo carboxilo del polipéptido mutante de la colicina. Es decir, tal polipéptido mimético de bajo peso molecular comprende una cadena peptídica de VHCDR1-VHFR2-VLCDR3, que se obtiene por la conexión de la región VHCDR1, la región VLCDR3, uniendo el segmento peptídico de VHCDR1-VHCDR2 y VLCDR3 de la cadena ligera del polipéptido del anticuerpo anti virus de EB. La secuencia de aminoácidos del péptido 1 antitumoral nuevo del mimético de anticuerpo se muestra en SEQ ID NO. 25. El mimético de anticuerpo solo comprende menos de 30 aminoácidos y tiene un peso molecular mucho menor que el anticuerpo natural de 150 aminoácidos. Cumple con el requisito de reconocimiento del antígeno mientras reduce substancialmente el peso molecular del polipéptido antitumoral, y contribuye a la capacidad de penetración tisular del polipéptido antitumoral de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un secuencia génica que codifique el polipéptido antitumoral de la presente invención. El gen del polipéptido antitumoral de la presente invención está formado por la unión operativa de un gen que codifica un polipéptido mutante de la colicina con un gen que codifica un polipéptido de un anticuerpo anti virus de EB o un polipéptido de un mimético de anticuerpo del mismo, en el que el polipéptido de la colicina y la secuencia génica del anticuerpo anti virus de EB son conocidos en la técnica, el gen del polipéptido mutante de la colicina se obtiene mediante las siguientes mutaciones puntuales en los correspondientes codones del gen del polipéptido de la colicina: G11A, H22G, A26G, V31L y H40D. Como resultado de la degeneración del código genético, un experto en la materia puede ajustar la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido antitumoral de la presente invención, sin modificar la secuencia de aminoácidos.

El plásmido recombinante de la presente invención significa que el vector original que porta el gen de la colicina de tipo silvestre tiene mutaciones por mutagénesis dirigida en los nucleótidos bicatenarios y tiene inserciones de codones mutantes en el sitio de la mutación diana, obteniendo así un vector mutante que comprende el gen del polipéptido mutante de la colicina. El mismo procedimiento de mutagénesis dirigida inserta un gen que codifica un mimético de anticuerpo de un anticuerpo anti virus de EB, en el extremo carboxilo de un gen del polipéptido mutante de la colicina, obteniendo así un plásmido recombinante de la presente invención. El vector original pSELECTTM-1 se adquiere en Promega Corp., el cual porta genes de la colicina la y una proteína inmunitaria. El procedimiento de mutagénesis dirigida sigue las instrucciones del kit de Strategene Corp. La presente invención lleva a cabo algunas mutagénesis dirigidas para preparar un polipéptido mutante de la colicina, en el que se mutan por mutagénesis dirigidas cinco codones. Por lo tanto, se diseñan 5 parejas de secuencias de cebadores (SEQ ID NO. 1-10). En el ejemplo de la presente invención, se diseñan 6 parejas de secuencias de cebadores para el gen del mimético de anticuerpo (SEQ ID NO. 11-22).

La presente invención también proporciona un método para la preparación del polipéptido antitumoral de la presente invención, que comprende transformar el vector recombinante obtenido anteriormente en una bacteria *E. coli* BL21 (DE3) técnicamente diseñada, seleccionar un clon positivo, aislar y purificar la proteína que expresa el clon positivo, obteniendo así el polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB de la presente invención.

El polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB proporcionado por la presente invención, puede utilizarse en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de un tumor provocado por el virus de EB. Puede fabricarse una composición clínica farmacéutica adecuada añadiendo el polipéptido de los antibióticos nuevos obtenidos en la presente invención a un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, u otros componentes opcionales.

La presente invención también proporciona la secuencia de aminoácidos y la secuencia génica del polipéptido mutante de la colicina la. En la presente invención puede utilizarse el polipéptido mutante, también puede utilizarse en la construcción de un polipéptido de anticuerpo con otros polipéptidos de direccionamiento. Los datos experimentales del ejemplo 3 en la invención demuestran que el medicamento de péptido que comprende el polipéptido mutante tiene una baja inmunogenicidad y que el polipéptido del anticuerpo formado por el polipéptido mutante con otro polipéptido de direccionamiento tiene una capacidad bactericida. El método de preparación es un procedimiento experimental rutinario en la técnica.

El polipéptido antitumoral nuevo que proporciona la invención tiene la ventaja del polipéptido antitumoral divulgado en la patente n.º ZL200410081446.8, es decir, un direccionamiento altamente específico y seguridad para células normales, y no proclive a desarrollar resistencia al fármaco. Al mismo tiempo, el polipéptido antitumoral de la presente invención se ha mutado en los restos aminoácido que tienden a producir una respuesta alérgica, la inmunogenicidad del polipéptido antitumoral que comprende tal polipéptido mutante es reducida, es decir, la posibilidad de reacción alérgica es reducida. La seguridad en el uso y el efecto de destrucción del tumor del medicamento de tales polipéptidos están mejorados. Este puede ser también un buen ejemplo para la mejora de otros medicamentos que comprendan un polipéptido de colicina.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Ilustración esquemática de la estructura del plásmido recombinante pCHCEB11, que comprende el gen del polipéptido del mimético de anticuerpo de V_HCDR1-V_HFR₂-V_LCDR₃ y el gen del polipéptido mutante de la colicina Ia.

Figura 2. Ilustración esquemática de la estructura del plásmido recombinante pCHCEB22, que comprende el gen del polipéptido del mimético de anticuerpo de V_HCDR1-V_HFR₂-(Rev)V_LCDR3 y el gen del polipéptido mutante de la colicina Ia.

Figura 3. El experimento 1 del efecto de sensibilización del polipéptido mutante de la colicina Ia.

(A) Se inyectan ratones Kunming por vía intraperitoneal con una dosis letal de SARM (ATCC BAA42) y se agrupan al azar en (1) el grupo de control, (2) el grupo de ampicilina, (3) el grupo del polipéptido frente a *S. aureus* (ZL 01128836.1), (4) el grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*.

(B) Después de 14 días, se agrupa un nuevo lote de ratones Kunming en un grupo de control y un grupo de ampicilina. Los ratones del grupo del polipéptido frente a *S. aureus* y del grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus* que sobreviven se agrupan en un grupo del polipéptido frente a *S. aureus* y un grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*, y el experimento se repite.

(C) Después de 41 días, se agrupa un nuevo lote de ratones Kunming en (1) el grupo de control, (2) el grupo de levofloxacina, (3) el grupo de ceftriaxona de sodio, (4) el grupo del polipéptido frente a *S. aureus*, y (5) los ratones del grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus* que sobreviven se agrupan con el grupo del polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa*, y un grupo del polipéptido 1 frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Figura 4. El experimento 3 del bajo efecto de sensibilización del polipéptido mutante de la colicina Ia.

(A) el suero del grupo del polipéptido frente a *S. aureus*/polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa*, título de 1:50.000;

(B) el suero del grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*/polipéptido 1 frente a *Pseudomonas aeruginosa*, título de 1:50.000.

(1) Semana 1, (2) Semana 2, (3) suero de la semana 7, (4) control negativo.

Figura 5. Comparación del efecto de destrucción del polipéptido antitumoral nuevo contra el linfoma de Burkitt provocado por el virus de EB.

(A) grupo de control, (B) grupo tratado con el polipéptido 1 antitumoral nuevo, (B) grupo tratado con el polipéptido 2 antitumoral nuevo.

Figura 6. Efecto de destrucción *in vitro* del polipéptido antitumoral nuevo contra células del linfoma de Burkitt provocado por el virus de EB y otras células tumorales.

(A) células de linfoma de Burkitt positivas para el VEB,

(B) células de linfoma de Burkitt negativas para el VEB,

(C) células de linfoma maligno de pacientes con SIDA positivas para el VEB.

(1) grupo de control, (2) grupo tratado con el polipéptido 1 antitumoral nuevo.

Figura 7. Efecto de destrucción del polipéptido antitumoral nuevo contra el tumor sólido crecido en ratones desnudos a los que se les ha implantado células del linfoma de Burkitt provocado por virus de EB.

(A) grupo de control.

(B) se inoculan en ambos flancos axilares ratones inmunodeficientes IDCG del grupo tratado con el polipéptido 1 antitumoral nuevo, con células del linfoma de Burkitt. Flecha en el lado izquierdo, linfoma negativo para VEB, flecha en el lado derecho, linfoma positivo para VEB.

Figura 8. Efecto de destrucción del polipéptido antitumoral nuevo contra el tumor sólido crecido en ratones desnudos a los que se les ha implantado células del linfoma de Burkitt provocado por virus de EB.

(A) corte de linfoma negativo para VEB del ratón de control, (B) corte de linfoma positivo para VEB del ratón de control, (C) corte de linfoma negativo para VEB del ratón tratado con el polipéptido 1 antitumoral nuevo, (D) corte de linfoma positivo para VEB del ratón tratado con el polipéptido 1 antitumoral nuevo.

Realizaciones

La invención se describirá ahora mediante la descripción de las realizaciones preferentes de la invención y con

referencia a los dibujos adjuntos.

El vector original pSELECT™-1 utilizado en la invención se adquiere en Promega Corp.

5 La bacteria *E. coli* BL21(DE3) técnicamente diseñada se adquiere en Novagen Corp.

Ejemplo 1. Construcción del plásmido recombinante que comprende el gen que codifica la colicina la mutante.

- El vector original es el plásmido pSELECT™-1 (8,3 kb) (adquirido en Promega Corp.) que porta genes de la colicina la y una proteína inmunitaria. Las secuencias de los cebadores oligonucleotídicos mostradas en las SEQ ID NO. 1-10, que codifican los aminoácidos mutantes, se unen respectivamente de forma operativa al gen de la colicina la de tipo silvestre mediante la tecnología de mutagénesis dirigida de oligonucleótidos bicatenarios (QuickChange™ Kit, Strategene Corp.), obteniendo un gen mostrado en SEQ ID NO. 23, que codifica un polipéptido mutante de la colicina la y un plásmido mutante. Después de esto, el gen de SEQ ID NO.26 o SEQ ID NO.28 se inserta en el plásmido mutante detrás del codón I626 del gen del polipéptido mutante de la colicina la, obteniendo dos plásmidos recombinantes pCHCEB11 (mostrado en la Figura 1) y pCHCEB22 (mostrado en la Figura 2), para el polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB. En SEQ ID NO.11-22 se muestran las secuencias de 6 parejas se cebadores oligonucleotídicos, los cuales están diseñados para la preparación del gen que codifica el anticuerpo frente al virus de EB en el plásmido recombinante. Para preparar el polipéptido el plásmido recombinante se transfecta en la bacteria técnicamente diseñada *E. coli* BL21 (DE3) (adquirido en Novagen Corp.). Los polipéptidos obtenidos se muestran en SEQ ID NO.29 (en lo sucesivo en el presente documento denominado "polipéptido 1 antitumoral nuevo") y SEQ ID NO.31 (en lo sucesivo en el presente documento denominado "polipéptido 2 antitumoral nuevo") en el listado de secuencias.
- 25 El procedimiento de mutagénesis dirigida de oligonucleótidos bicatenarios es según el kit QuickChange Site-Directed Mutagenesis de Strategene (n.º de catálogo 200518).

1. Preparación de los reactantes para la mutagénesis dirigida:

- 30 5 µl de tampón 10X
2 µl (10 ng) de plásmido original pSELECT™-1 que porta que porta los genes de los polipéptidos de la colicina la de tipo silvestre y una proteína inmunitaria.
1,25 µl (125 ng) del cebador oligonucleotídico 5'-3' diseñado
1,25 µl (125 ng) del cebador oligonucleotídico 3'-5' diseñado
35 1 µl de dNTP
50 µl agua bidestilada
1 µl de pfu
(proporcionado con el kit, excepto el plásmido, los cebadores y el agua bidestilada)
- 40 2. Amplificación por PCR, condiciones de amplificación: 25 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 35 segundos, hibridación a 53 °C durante 70 segundos, y extensión a 68 °C durante 17 minutos;
3. Se añade 1 µl de endonucleasa Dpn 1 para digerir la cadena de ADN parental (37 °C, 1 hora), se incuban juntos 1 µl de los reactantes y 50 µl de células competentes XL1-Blue en hielo durante 30 minutos, tras el choque térmico a 42 °C durante 45 segundos se incuba en hielo durante 2 minutos;
45 4. Se añaden 0,5 ml de medio de cultivo NZY, se agita a 37 °C y 220 rpm durante 1 hora. Se siembran en placa 50-100 µl (medio LB más agar al 1 % y ampicilina 50 µg/ml, durante una noche a 37 °C);
5. Tras 18 horas se toman colonias. El plásmido se extrae, se secuencian, se confirma que la mutación es satisfactoria;
6. Los 50 ng de plásmido recombinante finalmente obtenidos mediante la mutación en múltiples sitios se incuban en hielo durante 5 minutos con 40 µl células competentes *E. coli* BL-21(DE3), se trata con choque térmico a 42 °C durante 30 segundos y se incuba en hielo durante 2 minutos. Se añaden 160 µl de medio de cultivo SOC de Novagen Corp. y se siembra en placa tras agitar a 37 °C y 220 rpm durante 1 hora (medio LB más agar al 1 % y ampicilina 50 µg/ml, durante una noche a 37 °C).
7. Se toman colonias individuales para la amplificación, 8-16 litros de medio FB, 250 rpm, a 30 °C durante 4-5 horas, se somete a choque térmico a 42 °C y 250 rpm durante 30 minutos, y a 37 °C durante 2 horas. La bacteria se precipita mediante centrifugación a 6000g y 4 °C durante 20 minutos. Se le añaden 250 ml de PMSF 0,2 M al tampón borato 50 mM (EDTA 2 mM + DTT 2 mM) a 4 °C y a 50-80 ml de suspensión de bacteria, y se trata con ultrasonido (4 °C, 400 W, 2 minutos). Los residuos de la bacteria se centrifugan a alta velocidad (4 °C, 75.000g, 90 minutos). Se le añade al sobrenadante 5 millones de unidades de sulfato de estreptomicina para precipitar el ADN. Tras la precipitación mediante centrifugación a 15000g y 4 °C durante 10 minutos, el sobrenadante se dializa durante una noche en una bolsa para diálisis de peso molecular 15.000 en tampón borato 50 mM a 4 °C. Tras precipitación otra vez mediante centrifugación a 15000g y 4 °C durante 10 minutos, el sobrenadante se carga en un columna de intercambio iónico CM. La columna se eluye utilizando un gradiente de NaCl 0,1-0,3 M + tampón borato 50 mM, obteniendo el polipéptido antitumoral recombinante.
- 60

Las secuencias de los cebadores diseñados para la mutagénesis dirigida son las siguientes:

- SEQ ID NO. 1, cebador oligonucleotídico 5'-3' diseñado para la mutación G11A en el gen de la colicina:
cgt att aca aat ccc GCA gca gaa tgc ctg ggg
- 5 SEQ ID NO. 2, cebador oligonucleotídico 3'-5' diseñado para la mutación G11A en el gen de la colicina:
ccc cag cga ttc tgc TGC ggg att tgt aat acg
- SEQ ID NO. 3, cebador oligonucleotídico 5'-3' diseñado para la mutación H22G en el gen de la colicina:
gat tca gat ggc GGT aaa tta tgg gtg
- SEQ ID NO. 4, cebador oligonucleotídico 3'-5' diseñado para la mutación H22G en el gen de la colicina:
cac cca taa ttt ACC gcc atc tga atc
- 10 SEQ ID NO. 5, cebador oligonucleotídico 5'-3' diseñado para la mutación A26G en el gen de la colicina:
gaaa ttatgGGTgt tgatattat
- SEQ ID NO. 6, cebador oligonucleotídico 3'-5' diseñado para la mutación A26G en el gen de la colicina:
ataaatatacaacACCcataatttc
- 15 SEQ ID NO. 7, cebador oligonucleotídico 5'-3' diseñado para la mutación V31L en el gen de la colicina:
gt tgatattat CTC aaccctc cacgtgc
- SEQ ID NO. 8, cebador oligonucleotídico 3'-5' diseñado para la mutación V31L en el gen de la colicina:
gacacgtggagggttGAGataaatatcaac
- SEQ ID NO. 9, cebador oligonucleotídico 5'-3' diseñado para la mutación H40D en el gen de la colicina:
cgtgtcga tgtctttGATggtacccgc ctgcat
- 20 SEQ ID NO. 10, cebador oligonucleotídico 3'-5' diseñado para la mutación H40D en el gen de la colicina:
atgcaggcgggtaccATCaaagacatcgacag
- SEQ ID NO. 11, cebador 5'-3' para el gen de VHCDR1 en el plásmido recombinante pCHCEB11:
gcg aat aag ttc tgg ggt att TCC TTC GGT ATG CAT TGG GTG CGTCAGtaa ata aaa tat aag aca ggc
- 25 SEQ ID NO. 12, cebador 3'-5' para el gen de VHCDR1 en el plásmido recombinante pCHCEB11:
gcc tgt ctt ata ttt tat tta CTG ACG CAC CCA ATG CAT ACC GAA GGA aat acc cca gaa ctt att cgc
- SEQ ID NO. 13, cebador 5'-3' para el gen de VhFR2 en el plásmido recombinante pCHCEB11:
ggt atg cat tgg gtg cgt cag GCC CCC GAG AAA GGT CTG GAG TGG GTG GCC taa ata aaa tat aag aca ggc
- SEQ ID NO. 14, cebador 3'-5' para el gen de VhFR2 en el plásmido recombinante pCHCEB11:
gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGC CAC CCA CTC CAG ACCT TTT CTC GGG GGC ctg acg cac cca atg cat acc
- 30 SEQ ID NO. 15, cebador 5'-3' para el gen de (Rev)V1CDR3 en el plásmido recombinante pCHCEB11:
aaa ggt ctg gag tgg gtg gcc ACC TAC CCC TAC TCC TAC GGT CAG GGT taa ata aaa tat aag aca ggc
- SEQ ID NO. 16, cebador 3'-5' para el gen de (Rev)VLCDR3 en el plásmido recombinante pCHCEB11:
gcc tgt ctt ata ttt tat tta ACC CTG ACC GTA GGA GTA GGG GGT ggc cac cca ctc cag acc ttt
- 35 SEQ ID NO. 17, cebador 5'-3' para el gen de VHCDR1 en el plásmido recombinante pCHCEB22:
gcg aat aag ttc tgg ggt att TCC TTC GGT ATG CAT TGG GTG CGT CAG taa ata aaa tat aag aca ggc
- SEQ ID NO. 18, cebador 3'-5' para el gen de VHCDR1 en el plásmido recombinante pCHCEB22:
gcc tgt ctt ata ttt tat tta CTG ACG CAC CCA ATG CAT ACC GAA GGA aat acc cca gaa ctt att cgc
- SEQ ID NO. 19, cebador 5'-3' para el gen de VhFR2 en el plásmido recombinante pCHCEB22:
ggt atg cat tgg gtg cgt cag GCC CCC GAG AAA GGT CTG GAG TGG GTG GCC taa ataaaa tat aag aca ggc
- 40 SEQ ID NO. 20, cebador 3'-5' para el gen de VhFR2 en el plásmido recombinante pCHCEB22:
gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGC CAC CCA CTC CAG ACCT TTT CTC GGG GGC ctg acg cac cca atg cat acc
- SEQ ID NO. 21, cebador 5'-3' para el gen de VLCDR3 en el plásmido recombinante pCHCEB22:

aaa ggt ctg gag tgg gtg gcc GGT CAG GGT TAC TCC TAC CCC TAC ACC taa ata aaa tat aag aca ggc
 SEQ ID NO. 22, cebador 3'-5' para el gen de VLCDR3 en el plásmido recombinante pCHCEB22:
 gcc tgt ctt ata ttt tat tta GGT GTA GGG GTA GGA GTA ACC CTG ACC ggc cac cca ctc cag acc ttt

5 **Ejemplo 2.** Observación del efecto inmunitario de los polipéptidos antitumorales nuevos procedentes de los plásmidos recombinante pCHCEB11 y pCHCEB22.

Se inmunizan ratones con el polipéptido 1 antitumoral nuevo y el polipéptido 2 antitumoral nuevo preparados a partir de los plásmidos recombinante pCHCEB11 y pCHCEB22 obtenidos en el Ejemplo 1, y el polipéptido 1 antitumoral y
 10 el polipéptido 2 antitumoral procedentes de la invención anterior propiedad del inventor (documento ZL200410081446.8). Cada una de las proteínas descritas anteriormente se mezcla con adyuvante. La dosis de sensibilización y la dosis de refuerzo son una inyección intraperitoneal de 50 µg (0,5 ml) para cada ratón, en total cinco inyecciones a intervalos de 2 semanas. El título de los sueros se determinó mediante el método de ELISA indirecto. Los títulos de los ratones inmunizados con los polipéptidos 1 y 2 antitumorales nuevos preparados por la
 15 presente invención variaban de 10^{-3} a 10^{-4} , mientras que los títulos de los ratones inmunizados con el polipéptido 1 antitumoral y con el polipéptido 2 antitumoral variaban de 10^{-4} a 10^{-5} .

Puede observarse que la posibilidad de que se produzca una reacción de hipersensibilidad inducida por el polipéptido antitumoral nuevo de la presente invención es de 1 orden a 2 órdenes de magnitud más bajos que la
 20 posibilidad de que se produzca una reacción de hipersensibilidad inducida por el polipéptido antitumoral que comprende la colicina la de tipo silvestre.

Ejemplo 3. Experimento del bajo efecto de sensibilización del polipéptido mutante de la colicina la que forma el polipéptido antitumoral nuevo.

25 El plásmido mutante para el polipéptido mutante de la colicina la (que está mutada en los restos de aminoácido G11A, H22G, A26G, V31L y H40D en la cadena peptídica del dominio del canal acuoso) del Ejemplo 1 está unido operativamente a la feromona AgrD1 (YSTCDFIM) de *S. aureus* en el extremo N o el extremo C del polipéptido mutante, obteniéndose dos polipéptidos antibacterianos. El polipéptido obtenido por la unión de AgrD1 al extremo
 30 carboxilo de la colicina la mutante se denomina polipéptido 1 frente a *S. aureus*, y el polipéptido obtenido por la unión de AgrD1 al extremo amino de la colicina la mutante se denomina polipéptido 1 frente a *S. aureus*. El plásmido para la colicina la de tipo silvestre está unido en el extremo amino a la feromona AgrD1(YSTCDFIM) de *S. aureus*, obteniéndose el polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

35 Experimento 1: Se le inyecta a un lote de ratones Kunming una dosis letal de SARM (ATCC BAA42) por vía intraperitoneal y se agrupan al azar en (1) el grupo de control, (2) el grupo de ampicilina, (3) el grupo del polipéptido frente a *S. aureus*, (4) el grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*. Cada grupo consiste en 10 ratones.

Método de tratamiento:

40 Una hora después de la inyección intraperitoneal de la dosis letal de SARM (ATCC BAA42):

grupo de control: inyectados una vez con 0,5 ml de NaCl 0,3 M + tampón borato 50 mM a través de la vena de cola;

45 grupo de ampicilina: inyectados una vez con ampicilina 2,5 mg/kg a través de la vena de cola;
 grupo del polipéptido frente a *S. aureus*: inyectados una vez con polipéptido frente a *S. aureus* propiedad del inventor (ZL 01128836.1) 6 mg/kg a través de la vena de cola;
 grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*: inyectados una vez con polipéptido 1 frente a *S. aureus* 6 mg/kg a través de la vena de cola;

50 Resultado: Todos los ratones del grupo de control y del grupo de ampicilina murieron al cabo de dos días. Sobrevivió el 85 % de los ratones del grupo del polipéptido frente a *S. aureus* y del grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*.

Experimento 2: 14 días después del experimento 1 se agrupa un nuevo lote de ratones Kunming en un grupo de control y un grupo de ampicilina. Los ratones del grupo del polipéptido frente a *S. aureus* y del grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus* que sobrevivieron se agrupan en un grupo del polipéptido frente a *S. aureus* y un grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*, para repetir el experimento descrito anteriormente. Todos los ratones del grupo de control y del grupo de ampicilina murieron al cabo de dos días. Sobrevivió el 75 % de los ratones del grupo del polipéptido frente a *S. aureus* y el 90 % de los ratones del grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*.

60 Experimento 3: 41 días después del experimento 1 se agrupa un nuevo lote de ratones Kunming en un grupo de control, un grupo de levofloxacina y un grupo de ceftriaxona de sodio. Los ratones del grupo del polipéptido frente a *S. aureus* y del grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus* que sobrevivieron se agrupan en un grupo del

polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa* y un grupo del polipéptido 1 frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Se inyectaron ratones por vía intraperitoneal con una dosis letal de *Pseudomonas aeruginosa* de resistencia a múltiples fármacos (aislado clínico 13578 del Departamento de Medicina Experimental, Hospital de China Occidental de la Universidad de Sichuan). Después de una hora, se inyectaron una vez 0,5 ml de NaCl 0,3 M + tampón borato 50 mM, al grupo de control a través de la vena de cola;

se inyectó una vez levofloxacina 5 mg/kg al grupo de levofloxacina a través de la vena de cola;

se inyectó una vez ceftriaxona de sodio 30 mg/kg al grupo de ceftriaxona de sodio a través de la vena de cola;

se inyectó polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa* 8 mg/kg al grupo del polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa* a través de la vena de cola;

se inyectó polipéptido 1 frente a *Pseudomonas aeruginosa* 8 mg/kg al grupo del polipéptido 1 frente a *Pseudomonas aeruginosa* a través de la vena de cola.

Todos los ratones del grupo de control y del grupo de levofloxacina murieron al cabo de un día. El 25 % de los ratones del grupo de ceftriaxona de sodio sobrevivieron. El 60 % de los ratones del grupo del polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa* sobrevivieron. Todos los ratones del grupo del polipéptido 1 frente a *Pseudomonas aeruginosa* sobrevivieron. Está demostrado que los anticuerpos del hospedador interfieren con el efecto de destrucción del polipéptido mutante en menor grado que con el del polipéptido de tipo silvestre.

Véase la Figura 3.

A la semana 1, la semana 2 y la semana 7 del experimento, para detectar el anticuerpo en sangre se ensayó por el método de ELISA indirecto el suero de los ratones que sobrevivieron del grupo del polipéptido frente a *S. aureus*/grupo del polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa*, y del grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*/grupo del polipéptido 1 frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Se recubren los pocillos de una placa marcada con enzima con 100 ng/pocillo de colicina la de tipo silvestre y de polipéptido de la colicina la mutante. Los primeros anticuerpos son los sueros de los ratones que sobrevivieron del grupo del polipéptido frente a *S. aureus*/grupo del polipéptido 2 frente a *Pseudomonas aeruginosa*, y el grupo del polipéptido 1 frente a *S. aureus*/grupo del polipéptido 1 frente a *Pseudomonas aeruginosa*. El segundo anticuerpo es un anticuerpo de cabra anti ratón marcado. El primer anticuerpo de control negativo es leche al 5%-PBS. Los resultados del título 1:50.000 son los siguientes (véase la Figura 4):

	A (grupo del polipéptido frente a <i>S. aureus</i> /grupo del polipéptido 2 frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	B (grupo del polipéptido 1 frente a <i>S. aureus</i> /grupo del polipéptido 1 frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
1 (Semana 1)	0,914	0,254
2 (Semana 2)	1,623	0,598
3 (Semana 7)	2,911	1,41
4 (control)	0,065	0,069

Está demostrado que la posibilidad de que se produzca una reacción de hipersensibilidad del hospedador inducida por el polipéptido de la colicina la mutante preparado por la presente invención es menor que la posibilidad de que se produzca una reacción de hipersensibilidad del hospedador inducida por la colicina la de tipo silvestre.

Ejemplo 4. Efecto de destrucción *in vitro* del polipéptido antitumoral nuevo contra el linfoma de Burkitt provocado por el virus de EB.

La cepa de células positivas para el VEB y la cepa de células negativas para el VEB son cepas de células convencionales de la ATCC, EE.UU.

Cultivos de células: Se añaden lentamente 0,1 ml de células Raji reactivadas en suspensión en 3 ml de medio líquido 1640 (más suero al 10 %) en una placa de cultivo (tasa de dilución, 1:30), se mezcla y se cultiva en una incubador de 37 °C con CO₂. La cepa de células positivas para el VEB es ATCC CCL-86 (unas células de linfoma de Burkitt convencionales utilizadas en los laboratorios de todo el mundo, las células Raji, aisladas en 1963 de un niño africano de 12 años).

Las células de prueba se agrupan en 3 grupos.

El grupo 1 es un grupo de blanco, al que se añade una solución de conservación (tampón fosfato PB 10 mM+NaCl 0,2 M (pH 7,4)) sin el polipéptido antitumoral.

Al grupo 2 se le añade el polipéptido 1 antitumoral nuevo 200 µg/ml (plásmido pCHCEB11, solución de conservación, tampón fosfato PB 10 mM + NaCl 0,2 M, pH 7,4).

Al grupo 3 se le añade el polipéptido 2 antitumoral nuevo 200 µg/ml (plásmido pCHCEB22, solución de conservación, tampón fosfato PB 10 mM + NaCl 0,2 M, pH 7,4).

Después del cultivo durante 24 horas se añaden a la placa de cultivo los agentes de tratamiento descritos anteriormente. 72 horas después de la adición de los agentes de tratamiento se añadieron a la placa de cultivo 20 µl de yoduro de propidio (IP) 100 µMol y 10 minutos más tarde se observó al microscopio. El resultado muestra que las células del grupo de blanco crecen bien y que la mayoría de las células del grupo del polipéptido 1 antitumoral nuevo se tiñen de rojo por el IP, lo que demuestra que el polipéptido antitumoral destruye la membrana celular, lo que conduce a la muerte de las células tumorales. Al comparar el número de células muertas, el efecto del polipéptido 2 antitumoral nuevo no es tan bueno entre los dos polipéptidos antitumorales nuevos, véase la Figura 5.

Ejemplo 5. Observación de la tinción de fluorescencia múltiple para el efecto de destrucción *in vitro* del polipéptido antitumoral nuevo contra células del linfoma de Burkitt provocado por el virus de EB y otras células tumorales.

Las condiciones del cultivo celular son las mismas que en el Ejemplo 2. En este experimento se utilizan tres cepas celulares: Cepa de células positivas para el virus de EB: ATCC CCL-86 (células Raji, células de linfoma de Burkitt); ATCC CRL-2230, una cepa de células de linfoma sarcoma maligno procedente un hombre de 46 años con SIDA, que es positivo para virus de EB y virus del sarcoma de Kaposi; cepa de células negativas para el virus de EB: ATCC CRL-1648(CA-46, unas células aisladas de líquido ascítico de un paciente estadounidense con linfoma de Burkitt).

Cada cepa se agrupa en el grupo de ensayo 2. Al grupo 1 se le añade una solución de conservación (tampón fosfato PB 10 mM+NaCl 0,2 M (pH 7,4)) sin el polipéptido antitumoral nuevo. Al grupo 2 se le añade el polipéptido 1 antitumoral nuevo 200 µg/ml (plásmido pCHCEB11), la solución de conservación es tampón fosfato PB 10 mM+NaCl 0,2 M pH 7,4.

Después del cultivo durante 24 horas se añaden a la placa de cultivo los agentes de tratamiento de los grupos descritos anteriormente. 72 horas después de la adición de los agentes de tratamiento se añaden a la placa de cultivo dos tipos de colorantes fluorescentes, es decir, 20 µl de FITC 50 µMol y 20 µl de Rodamina-123 50 uMol y 10 minutos más tarde se observan con un microscopio Olympus IX-71.

El resultado muestra que la cepa de células tumorales negativas para VEB crece bien tras el tratamiento con el polipéptido 1 antitumoral nuevo y que en la mayor parte de las células de todas las cepas de células tumorales positivas para el VEB aparece la desaparición de mitocondrias y núcleos, están hinchadas y hay necrosis, la mayor parte de ellas están muertas. Aparentemente, en comparación con el experimento de tinción con IP del Ejemplo 4, el resultado del experimento de tinción de fluorescencia múltiple muestra de forma más clara el potente efecto de destrucción del polipéptido 1 antitumoral nuevo frente a las células tumorales positivas para virus de EB, véase la Figura 6.

Las células tumorales negativas para el VEB crecen bien, lo que significa que el polipéptido antitumoral nuevo no ataca a las células sin el antígeno de superficie del virus de EB en la membrana celular. Se sugiere que el polipéptido antitumoral nuevo de la presente invención tiene una especificidad de direccionamiento y una seguridad ideales.

Ejemplo 6. Efecto de destrucción del polipéptido antitumoral nuevo contra un tumor sólido crecido en ratones desnudos a los que se les ha implantado células de linfoma de Burkitt provocado por virus de EB.

Los ratones inmunodeficientes IDCG se adquirieron en el Shanghai Laboratory Animal Center, Chinese Academy of Sciences. Los ratones se alimentan siguiendo los requisitos de alimentación convencionales. El agua, la paja de las camas y el pienso se esterilizan con temperaturas altas o con luz UV. Se alimenta a los ratones una semana en condiciones asépticas relativas y se utilizan en el experimento de inoculación si no hay anomalías.

Las suspensiones de células Raji (ATCC CCL-86) y 1648 (ATCC CRL-1648) en fase de crecimiento exponencial se recogen en tubos de centrifuga de 50 ml y se centrifugan a 4 °C. Después se descarta el sobrenadante. Las células se resuspenden en medio de cultivo líquido 1640 (más suero de ternera) hasta $1,0 \times 10^7$ células/ml. Se inyecta a los ratones 0,1 ml de suspensión de células Raji en la axila izquierda y 0,1 ml de suspensión de células 1648 (ATCC CRL-1648) en la axila derecha por vía subcutánea.

3-4 días tras la inyección el tumor crece hasta aproximadamente 2 x 2 mm. Los ratones que portan tumor se agrupan en:

(grupo A) solución de conservación (tampón fosfato PB 10 mM+NaCl 0,2 M (pH 7,4)) sin el polipéptido antitumoral, como grupo de control;

(grupo B) el polipéptido 1 antitumoral nuevo (plásmido pCHCEB11), como grupo de tratamiento, 300 µg/ratón/día (calculado como 25 g), durante 20 días consecutivos.

Se inyectaron diez ratones de cada grupo con 0,5 ml vía subcutánea dos veces al día por durante 20 días consecutivos. Cada día se observa y documenta el comportamiento de los ratones. Se determina el tamaño del tumor y se fotografía cada dos días.

El resultado (véase la Figura 7) muestra que el crecimiento del tumor en el grupo B del polipéptido antitumoral nuevo está significativamente inhibido, en el que los tumores desaparecen en 7 ratones y los tumores de los otros 3 ratones son claramente más pequeños que los del grupo de control. El polipéptido antitumoral nuevo es eficaz para inhibir en ratones el crecimiento de un tumor sólido provocado por células de linfoma positivo para el VEB. Sin embargo, el polipéptido antitumoral nuevo es ineficaz para inhibir en ratones el crecimiento de un tumor sólido provocado por células de linfoma negativo para el VEB.

15 **Ejemplo 7.** Observación patológica de un experimento de eliminación tumoral *in vivo*

Observación histopatológica de tumores: Al final del experimento del Ejemplo 6 se sacrifican los ratones. Los tumores se extraen y se fijan en formalina al 10 %. Los cortes de parafina se tiñen con HE y se observan con microscopía óptica rutinaria.

Observados al microscopio los tumores sólidos de los ratones del grupo de control proliferan vigorosamente; las células de los tumores sólidos positivos para el VEB de los ratones del grupo del polipéptido antitumoral nuevo se reducen de forma notable. La mayor parte de las masas celulares del corte son células tumorales necróticas y se observa una gran cantidad de infiltración linfocítica peritumoral. El resultado de la histopatología sugiere que durante el tratamiento de 20 días el polipéptido antitumoral nuevo destruye casi todas las células tumorales del tumor sólido (véase la Figura 8, D).

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Protein Design Lab, Ltd.,
 <120> Un polipéptido nuevo frente a un tumor provocado por el virus de EB, y el uso y un método de preparación del mismo.

35 <130> EP82366HV163pau
 <140> EP10836940.6
 <141> 26/02/2010

40 <150> PCT/CN2010/070762
 <151> 26/02/2010
 <150> CN200910242838.0
 <151> 17/12/2009

45 <160> 32
 <170> BiSSAP 1.0

50 <210> 1
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 5'-3' diseñado para la mutación G11 A en el gen de la colicina"

60 /organismo="Secuencia artificial"
 <400> 1
 cgattacaa atccgcgcgcgc agaatcgctg ggg 33

65 <210> 2

<211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..33
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 3j⁻-5j⁻ diseñado para la mutación G1 1A en el gen de la colicina"
 10 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 2
 cccagcgat tctgctgagg gattgtaac acg 33

15 <210> 3
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 5j⁻-3j⁻ diseñado para la mutación H2 2G en el gen de la colicina"
 25 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 3
 gattcagatg gcggtaaatt atgggtg 27

30 <210> 4
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..27
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 3j⁻-5j⁻ diseñado para la mutación H2 2G en el gen de la colicina"
 40 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 4
 caccataat ttaccgcat ctgaatc 27

45 <210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..24
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 5j⁻-3j⁻ diseñado para la mutación A2 6G en el gen de la colicina"
 55 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 5
 gaaattatgg gtgttgatat ttat 24

60 <210> 6
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<221> fuente
 <222> 1..25
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 3j⁻-5j⁻ diseñado para la mutación A2 6G en el gen de la colicina"
 5 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 6
 ataaatatac aacacccata atttc 25

 10 <210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 5j⁻-3j⁻ diseñado para la mutación V3 1L en el gen de la colicina"
 20 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 7
 gttgatattt atctcaaccc tccacgtgtc 30

 25 <210> 8
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..30
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 3j⁻-5j⁻ diseñado para la mutación V3 1L en el gen de la colicina"
 35 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 8
 gacacgtgga ggggtgagat aaatatcaac 30

 40 <210> 9
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 5j⁻-3j⁻ diseñado para la mutación H4 0D en el gen de la colicina"
 50 /organismo="Secuencia artificial"

 <400> 9
 cgtgtcgatg tctttgatgg taccccgct gcat 34

 55 <210> 10
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..34
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador oligonucleotídico 3j⁻-5j⁻ diseñado para la mutación H4 OD en el gen de la colicina"

```

/organismo="Secuencia artificial"

<400> 10
atgcaggcgg ggtaccatca aagacatcga cacg      34
5
<210> 11
<211> 69
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10
<220>
<221> fuente
<222> 1..69
<223> /mol_type="ADN"
15
/nota="cebador 5'-3' para el gen de VHCDR1 en el plásmido recombinante pCHCEB11"
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 11

gcgaataagt tctgggggtat ttccttcggt atgcattggg tgcgtcagta aataaaatat      60
aagacaggc                                          69
20
<210> 12
<211> 69
<212> ADN
25
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..69
30
<223> /mol_type="ADN"
/nota="cebador 3'-5' para el gen de VHCDR1 en el plásmido recombinante pCHCEB11"
/organismo="Secuencia artificial"

<400> 12
35
gcctgtctta tattttatatt actgacgcac ccaatgcata ccgaaggaaa taccacagaa      60
cttattcgc                                          69

<210> 13
<211> 72
<212> ADN
40
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
45
<222> 1..72
<223> /mol_type="ADN"
/nota="cebador 5'-3' para el gen de VHFR2 en el plásmido recombinante p CHCEB11"
/organismo="Secuencia artificial"

50
<400> 13

ggtatgcatt gggcgcgtca ggcccccgag aaaggctctgg agtgggtggc ctaaataaaa      60
tataagacag gc                                          72

<210> 14
55
<211> 73

```

ES 2 634 944 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..73
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador 3j-5j para el gen de VHFR2 en el plásmido recombinante p CHCEB11"
 /organismo="Secuencia artificial"

10 <400> 14

gcctgtctta tattttattt aggccacca ctccagacct tttctcgggg gcctgacgca 60
 cccaatgcat acc 73

15 <210> 15
 <211> 69
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..69
 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador 5j-3j para el gen de (Rev)VICDR3 en el plásmido recombinante pCHCEB11"
 25 /organismo="Secuencia artificial"

<400> 15

aaaggtctgg agtgggtggc cacctacccc tactcctacg gtcaggggta aataaaatat 60
 aagacaggc 69

30 <210> 16
 <211> 66
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <222> 1..66
 <223> /mol_type="ADN"
 40 /nota="cebador 3j-5j para el gen de (Rev)VLCDR3 en el plásmido recombinante pCHCEB11"
 /organismo="Secuencia artificial"

<400> 16

gcctgtctta tattttattt aaccctgacc gtaggagtag ggggtggcca ccactccag 60
 accttt 66

45 <210> 17
 <211> 69
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..69
 55 <223> /mol_type="ADN"
 /nota="cebador 5j-3j para el gen de VHCDR1 en el plásmido recombinante pCHCEB22"

ES 2 634 944 T3

```

/organismo="Secuencia artificial"
<400> 17

      gcgaataagt tctggggtat ttccttcggt atgcattggg tgcgtcagta aataaaatat      60
5      aagacaggc                                                                    69

<210> 18
<211> 69
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<222> 1..69
15 <223> /mol_type="ADN"
    /nota="cebador 3j-5j para el gen de VHCDR1 en el plásmido recombinante pCHCEB22"
    /organismo="Secuencia artificial"

<400> 18
20

      gcctgtctta tattttatatt actgacgcac ccaatgcata ccgaaggaaa taccacagaa      60
      cttattcgc                                                                    69

<210> 19
<211> 72
25 <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
30 <222> 1..72
    <223> /mol_type="ADN"
    /nota="cebador 5j-3j para el gen de VHFR2 en el plásmido recombinante p CHCEB22"
    /organismo="Secuencia artificial"

35 <400> 19

      ggtatgcatt ggtgcggtca ggcccccgag aaaggtcttg agtgggtggc ctaaataaaa      60
      tataagacag gc                                                                    72

<210> 20
40 <211> 73
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

<220>
45 <221> fuente
    <222> 1..73
    <223> /mol_type="ADN"
    /nota="cebador 3j-5j para el gen de VHFR2 en el plásmido recombinante p CHCEB22"
    /organismo="Secuencia artificial"
50 <400> 20

```

	gcctgtcttta tattttatatt aggccaccca ctccagacct tttctcgggg gcctgacgca	60
	cccaatgcat acc	73
5	<210> 21 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <221> fuente <222> 1..69 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador 5j-3j para el gen de VLCDR3 en el plásmido recombinante pCHCEB22" /organismo="Secuencia artificial"	
15	<400> 21	
	aaaggtcttg agtgggtggc cggtcagggt tactctacc cctacaccta aataaaatat	60
	aagacaggc	69
20	<210> 22 <211> 69 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <221> fuente <222> 1..69 <223> /mol_type="ADN" /nota="cebador 3j-5j para el gen de VLCDR3 en el plásmido recombinante pCHCEB22" /organismo="Secuencia artificial"	
30	<400> 22	
	gcctgtcttta tattttatatt aggtgtaggg gtaggagtaa ccctgaccgg ccaccactc	60
	cagaccttt	69
35	<210> 23 <211> 1878 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <221> fuente <222> 1..1878 <223> /mol_type="ADN" /nota="El gen que codifica el polipéptido mutante de la colicina la" /organismo="Secuencia artificial"	
45	<400> 23	

ES 2 634 944 T3

atgtctgacc ctgtacgtat tacaatccc gcagcagaat cgctggggta tgattcagat	60
ggcggtgaaa ttatgggtgt tgatatttat ctcaaccctc cacgtgtcga tgtctttgat	120
ggtaccccg cctgcatggag ttccttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg	180
gttgatgatt ccccaaccg aagtgatatc gaaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac	240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa	300
cgcctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt	360
gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag	420
ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca	480
gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg	540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc	600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggatttc tggacaccg gttgtcagag	660
ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc	720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg	780
acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa	840
cagaaaaaca cgctgacgg caaaacgata gtttcccctg aaaaattccc ggggcggttca	900
tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccggtac gataaaaatc	960
acaaccagcg cagtcatcga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt	1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtgacaga ggatgtggaa	1080
ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg	1140
cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgcgg taaattcggc gagaaataac	1200
ctcagtgcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag	1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa	1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg	1380
aatcagttt cagaaaaata tggtgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg	1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatgtt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac	1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt	1560
gagtctgtga agctgtctga tatatcgtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga	1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg	1680

```

acagagaact ggogtcctct ttttgtaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca      1740
acggctcttg tggcactggg cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg      1800
tatggtttac tgatggctgt caccgggtgcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg      1860
aataagttct ggggtatt                                     1878

```

<210> 24

<211> 625

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> FUENTE

10 <222> 1..625

<223> /mol_type="proteína"

/nota="La secuencia de aminoácidos del polipéptido mutante de la colicina la

/organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 24

```

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Ala Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1          5          10          15
Asp Ser Asp Gly Gly Glu Ile Met Gly Val Asp Ile Tyr Leu Asn Pro
20          25          30
Pro Arg Val Asp Val Phe Asp Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
35          40          45
Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
50          55          60
Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
65          70          75          80
Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
85          90          95
Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu
100         105         110
Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile
115         120         125
Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly
130         135         140
Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu
145         150         155         160
Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg
165         170         175
Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala
180         185         190
Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg
195         200         205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly
210         215         220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly
225         230         235         240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu
245         250         255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg
260         265         270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr
275         280         285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser

```

```

      290      295      300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr
305      310      315      320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser
      325      330      335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro
      340      345      350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu
      355      360      365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn
      370      375      380
Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu
385      390      395      400
Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala
      405      410      415
Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn
      420      425      430
Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr
      435      440      445
Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu
      450      455      460
Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln
465      470      475      480
Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr
      485      490      495
Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg
      500      505      510
Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser
      515      520      525
Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe
530      535      540
Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr
545      550      555      560
Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly
      565      570      575
Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly
      580      585      590
Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly
      595      600      605
Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly
      610      615      620
Ile
625

```

5 <210> 25
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..28
 <223> /mol_type="proteína"
 /nota="La secuencia de aminoácidos de VHCDR1-VHFR2-VLCDR3 del anticuerpo mimético"
 /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 25

ES 2 634 944 T3

Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu
 1 5 10 15
 Trp Val Ala Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr

20

25

<210> 26

<211> 84

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..84

<223> /mol_type="ADN"

/nota="La secuencia de nucleótidos que codifica VHCDR1-VHFR2-VLCDR3 del anticuerpo mimético"

/organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 26

tccttcggta tgcattgggt gogtcaggcc cccgagaaag gtctggagtg ggtggccggt 60

cagggttact cctacccta cacc 84

<210> 27

20 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> fuente

<222> 1..28

<223> /mol_type="proteína"

/nota="La secuencia de aminoácidos de VHCDR1-VHFR2-(Rev)VLCDR3 del anticuerpo mimético"

/organismo="Secuencia artificial"

30 <400> 27

Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu
 1 5 10 15
 Trp Val Ala Thr Tyr Pro Tyr Ser Tyr Gly Gln Gly
 20 25

35 <210> 28

<211> 84

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<221> fuente

<222> 1..84

<223> /mol_type="ADN"

45 /nota="La secuencia de nucleótidos que codifica VHCDR1-VHFR2-(Rev)VLCDR3 del anticuerpo mimético"

/organismo="Secuencia artificial"

<400> 28

ES 2 634 944 T3

```
tccttcggta tgcattgggt gcgtcaggcc cccgagaaag gtctggagtg ggtggccacc 60
taccctact cctacggtca ggggt 84
```

```
5 <210> 29
  <211> 653
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
  <221> FUENTE
  <222> 1..653
  <223> /mol_type="proteína"
  /nota="La secuencia de aminoácidos 1 del polipéptido frente al tumor provocado por el virus EB"
  /organismo="Secuencia artificial"

15 <400> 29
```

```

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Ala Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1      5      10      15
Asp Ser Asp Gly Gly Glu Ile Met Gly Val Asp Ile Tyr Leu Asn Pro
20     25     30
Pro Arg Val Asp Val Phe Asp Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
35     40     45
Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
50     55     60
Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
65     70     75     80
Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
85     90     95
Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu
100    105    110
Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Ala Asp Ile
115    120    125
Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly
130    135    140
Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu
145    150    155    160
Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg
165    170    175
Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala
180    185    190
Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg
195    200    205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly
210    215    220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly
225    230    235    240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu
245    250    255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg
260    265    270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr
275    280    285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser
290    295    300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr
305    310    315    320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser
325    330    335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro
340    345    350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu
355    360    365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn
370    375    380
Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu

```

```

385          390          395          400
Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala
          405          410          415
Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn
          420          425          430
Gln Lys Ile Ala Glu Glu Lys Arg Lys Gln Asp Glu Leu Lys Ala Thr
          435          440          445
Lys Asp Ala Ile Asn Phe Thr Thr Glu Phe Leu Lys Ser Val Ser Glu
          450          455          460
Lys Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Gln Leu Ala Arg Glu Met Ala Gly Gln
          465          470          475          480
Ala Lys Gly Lys Lys Ile Arg Asn Val Glu Glu Ala Leu Lys Thr Tyr
          485          490          495
Glu Lys Tyr Arg Ala Asp Ile Asn Lys Lys Ile Asn Ala Lys Asp Arg
          500          505          510
Ala Ala Ile Ala Ala Ala Leu Glu Ser Val Lys Leu Ser Asp Ile Ser
          515          520          525
Ser Asn Leu Asn Arg Phe Ser Arg Gly Leu Gly Tyr Ala Gly Lys Phe
          530          535          540
Thr Ser Leu Ala Asp Trp Ile Thr Glu Phe Gly Lys Ala Val Arg Thr
          545          550          555          560
Glu Asn Trp Arg Pro Leu Phe Val Lys Thr Glu Thr Ile Ile Ala Gly
          565          570          575
Asn Ala Ala Thr Ala Leu Val Ala Leu Val Phe Ser Ile Leu Thr Gly
          580          585          590
Ser Ala Leu Gly Ile Ile Gly Tyr Gly Leu Leu Met Ala Val Thr Gly
          595          600          605
Ala Leu Ile Asp Glu Ser Leu Val Glu Lys Ala Asn Lys Phe Trp Gly
          610          615          620
Ile Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
          625          630          635          640
Glu Trp Val Ala Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
          645          650

```

<210> 30

<211> 1962

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1962

<223> /mol_type="ADN"

/nota="La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos 1 del polipéptido frente al tumor provocado por el virus de EB"

/organismo="Secuencia artificial"

15

<400> 30

```

atgtctgacc ctgtacgtat tacaaatccc gcagcagaat cgctggggta tgattcagat      60
ggcggtgaaa ttatgggtgt tgatatttat ctcaaccctc cacgtgtcga tgtctttgat      120
ggtagcccgct ctgcatggag ttccttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtg      180
gttgatgatt ccccaaccg aagtgatatc gaaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac      240
aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa      300
cgcctctctg cggcgattgc tgcaagggaa aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt      360
gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag      420

```

ES 2 634 944 T3

```

ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca      480
gagagccgga tgctgtttgc tgatgetgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg      540
tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc      600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacacccg gttgtcagag      660
ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc      720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaaact cagttcagtg      780
acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa      840
cagaaaaaca cgcctgacgg caaaacgata gtttccctcg aaaaattccc ggggcggttca      900
tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccggtac gataaaaaatc      960
acaaccagcg cagtcatcga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggg      1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtgacaga ggatgtggaa      1080
ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg      1140
cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgcgg taaattcggc gagaaataac      1200
ctcagtgcca gaacaaatga gcaaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag      1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcacaaatc agaagatagc ggaagagaaa      1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg      1380
aatcagttt cagaaaaata tggtgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg      1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatggt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac      1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt      1560
gagtctgtga agctgtctga tatatogtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga      1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgetgac tggatcactg agtttggtta ggctgtccgg      1680
acagagaact ggcgtcctct ttttggttaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca      1740
acggctcttg tggcactggg cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg      1800
tatggtttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg      1860
aataagttct ggggtatttc cttcggtatg cattgggtgc gtcaggcccc cgagaaaggt      1920
ctggagtggg tggccgggtca gggttaactc taccctaca cc      1962

```

5 <210> 31
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> FUENTE
 <222> 1..653
 <223> /mol_type="proteína"
 /nota="La secuencia de aminoácidos 2 del polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB"

/organismo="Secuencia artificial"
<400> 31

```

Ser Asp Pro Val Arg Ile Thr Asn Pro Ala Ala Glu Ser Leu Gly Tyr
1      5      10      15
Asp Ser Asp Gly Gly Glu Ile Met Gly Val Asp Ile Tyr Leu Asn Pro
20     25     30
Pro Arg Val Asp Val Phe Asp Gly Thr Pro Pro Ala Trp Ser Ser Phe
35     40     45
Gly Asn Lys Thr Ile Trp Gly Gly Asn Glu Trp Val Asp Asp Ser Pro
50     55     60
Thr Arg Ser Asp Ile Glu Lys Arg Asp Lys Glu Ile Thr Ala Tyr Lys
65     70     75     80
Asn Thr Leu Ser Ala Gln Gln Lys Glu Asn Glu Asn Lys Arg Thr Glu
85     90     95
Ala Gly Lys Arg Leu Ser Ala Ala Ile Ala Ala Arg Glu Lys Asp Glu
100    105    110
Asn Thr Leu Lys Thr Leu Arg Ala Gly Asn Ala Asp Ala Asp Ile
115    120    125
Thr Arg Gln Glu Phe Arg Leu Leu Gln Ala Glu Leu Arg Glu Tyr Gly
130    135    140
Phe Arg Thr Glu Ile Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Arg Leu His Thr Glu
145    150    155    160
Ser Arg Met Leu Phe Ala Asp Ala Asp Ser Leu Arg Ile Ser Pro Arg
165    170    175
Glu Ala Arg Ser Leu Ile Glu Gln Ala Glu Lys Arg Gln Lys Asp Ala
180    185    190
Gln Asn Ala Asp Lys Lys Ala Ala Asp Met Leu Ala Glu Tyr Glu Arg
195    200    205
Arg Lys Gly Ile Leu Asp Thr Arg Leu Ser Glu Leu Glu Lys Asn Gly
210    215    220
Gly Ala Ala Leu Ala Val Leu Asp Ala Gln Gln Ala Arg Leu Leu Gly
225    230    235    240
Gln Gln Thr Arg Asn Asp Arg Ala Ile Ser Glu Ala Arg Asn Lys Leu
245    250    255
Ser Ser Val Thr Glu Ser Leu Asn Thr Ala Arg Asn Ala Leu Thr Arg
260    265    270
Ala Glu Gln Gln Leu Thr Gln Gln Lys Asn Thr Pro Asp Gly Lys Thr
275    280    285
Ile Val Ser Pro Glu Lys Phe Pro Gly Arg Ser Ser Thr Asn His Ser
290    295    300
Ile Val Val Ser Gly Asp Pro Arg Phe Ala Gly Thr Ile Lys Ile Thr
305    310    315    320
Thr Ser Ala Val Ile Asp Asn Arg Ala Asn Leu Asn Tyr Leu Leu Ser
325    330    335
His Ser Gly Leu Asp Tyr Lys Arg Asn Ile Leu Asn Asp Arg Asn Pro
340    345    350
Val Val Thr Glu Asp Val Glu Gly Asp Lys Lys Ile Tyr Asn Ala Glu
355    360    365
Val Ala Glu Trp Asp Lys Leu Arg Gln Arg Leu Leu Asp Ala Arg Asn
370    375    380
Lys Ile Thr Ser Ala Glu Ser Ala Val Asn Ser Ala Arg Asn Asn Leu
385    390    395    400
Ser Ala Arg Thr Asn Glu Gln Lys His Ala Asn Asp Ala Leu Asn Ala
405    410    415
Leu Leu Lys Glu Lys Glu Asn Ile Arg Asn Gln Leu Ser Gly Ile Asn
420    425    430

```

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

<210> 32

<211> 1962

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <222> 1..1962

<223> /mol_type="ADN"

/nota="La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos 2 del polipéptido nuevo frente al tumor provocado por el virus de EB"

/organismo="Secuencia artificial"

15

<400> 32

atgtctgacc ctgtacgtat tacaatccc gcagcagaat cgctggggta tgattcagat 60
 ggcggtgaaa ttatgggtgt tgatatttat ctcaaccctc cacgtgtcga tgtctttgat 120
 ggtaccccg ctcgatggag ttccttcggg aacaaaacca tctggggcgg aaacgagtgg 180
 gttgatgatt cccaaccg aagtgatatc gaaaaaggg acaaggaaat cacagcgtac 240
 aaaaacacgc tcagcgcgca gcagaaagag aatgagaata agcgtactga agccggaaaa 300
 cgcctctctg cggcgattgc tgcaaggga aaagatgaaa acacactgaa aacactccgt 360
 gccggaaacg cagatgccgc tgatattaca cgacaggagt tcagactcct gcaggcagag 420
 ctgagagaat acggattccg tactgaaatc gccggatatg acgccctccg gctgcataca 480
 gagagccgga tgctgtttgc tgatgctgat tctcttcgta tatctccccg ggaggccagg 540

ES 2 634 944 T3

tcgttaatcg aacaggctga aaaacggcag aaggatgcgc agaacgcaga caagaaggcc	600
gctgatatgc ttgctgaata cgagcgcaga aaaggtattc tggacacccg gttgtcagag	660
ctggaaaaaa atggcggggc agcccttgcc gttcttgatg cacaacaggc ccgtctgctc	720
gggcagcaga cacggaatga cagggccatt tcagaggccc ggaataaact cagttcagtg	780
acggaatcgc ttaacacggc ccgtaatgca ttaaccagag ctgaacaaca gctgacgcaa	840
cagaaaaaca cgctgacgg caaaacgata gtttcccctg aaaaattccc ggggcgttca	900
tcaacaaatc attctattgt tgtgagcggg gatccgagat ttgccggtac gataaaaatc	960
acaaccagcg cagtcatcga taaccgtgca aacctgaatt atcttctgag ccattccggt	1020
ctggactata aacgcaatat tctgaatgac cggaatccgg tggtgacaga ggatgtggaa	1080
ggtgacaaga aaatttataa tgctgaagtt gctgaatggg ataagttacg gcaaagattg	1140
cttgatgcca gaaataaaat cacctctgct gaatctgcgg taaattcggc gagaaataac	1200
ctcagtgcca gaacaaatga gcaaagcat gcaaatgacg ctcttaatgc cctgttgaag	1260
gaaaaagaga atatacgtaa ccagctttcc ggcatcaatc agaagatagc ggaagagaaa	1320
agaaaacagg atgaactgaa ggcaacgaaa gacgcaatta atttcacaac agagttcctg	1380
aaatcagttt cagaaaaata tggtgcaaaa gctgagcagt tagccagaga gatggccggg	1440
caggctaaag ggaagaaaat acgtaatggt gaagaggcat taaaaacgta tgaaaagtac	1500
cgggctgaca ttaacaaaaa aattaatgca aaagatcgtg cagcgattgc cgcagccctt	1560
gagtctgtga agctgtctga tatatogtct aatctgaaca gattcagtcg gggactggga	1620
tatgcaggaa aatttacaag tcttgctgac tggatcactg agtttggtaa ggctgtccgg	1680
acagagaact ggcgtcctct ttttggtaaa acagaaacca tcatagcagg caatgccgca	1740
acggctcttg tggcactggt cttcagtatt cttaccggaa gcgctttagg cattatcggg	1800
tatggtttac tgatggctgt caccggtgcg ctgattgatg aatcgcttgt ggaaaaagcg	1860
aataagttct ggggtatttc cttcggtatg cattgggtgc gtcaggcccc cgagaaaggt	1920
ctggagtggg tggccaccta cccctactcc tacggtcagg gt	1962

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido para su uso en un método para el tratamiento de un tumor provocado por el virus de EB, en el que el polipéptido está formado por la unión operativa de un polipéptido mutante de la colicina que puede formar canales iónicos con un polipéptido de un anticuerpo anti virus de EB o un polipéptido de un mimético de anticuerpo anti virus de EB, en el que el polipéptido mutante de la colicina que puede formar canales iónicos se obtiene mediante la mutación de los restos de aminoácido G11A, H22G, A26G, V31L y H40D, en la cadena peptídica de la colicina la de tipo silvestre, la secuencia de aminoácidos del polipéptido del anticuerpo anti virus de EB es la misma que la del polipéptido del anticuerpo monoclonal que secreta el hibridoma HB-168 de la ATCC y en el que el polipéptido del mimético de anticuerpo es un péptido conectado de la región CDR1 de la cadena pesada, que une el segmento peptídico de las CDR1-CDR2 de la cadena pesada y la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo anti virus de EB que secreta el hibridoma HB-168 de la ATCC.
2. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido frente al tumor provocado por el virus de EB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 29.
3. Un gen que codifica el polipéptido como se define en la reivindicación 1 o 2.
4. El gen de acuerdo con la reivindicación 3, que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO. 30.
5. Un plásmido recombinante que comprende el gen de la reivindicación 3.
6. Un método para preparar el polipéptido como se define en la reivindicación 1 o 2, que comprende las etapas de: transformar el plásmido recombinante de la reivindicación 5 en un sistema de expresión para la expresión y aislar el polipéptido expresado.
7. Uso de un polipéptido como se define en la reivindicación 1 o 2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento y la prevención de un tumor provocado por el virus de EB.
8. Un polipéptido mutante de la colicina la, que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO. 24.
9. Un gen que codifica el polipéptido mutante de la colicina la de la reivindicación 8.
10. Uso del gen de la reivindicación 9 en la preparación de un medicamento peptídico, uniendo operativamente dicho gen con un gen que expresa el péptido, clonando en un vector de expresión, transformando después el vector de expresión en un sistema de expresión y aislando el polipéptido expresado.
11. Un polipéptido frente al tumor provocado por el virus de EB, que está formado por la unión operativa de un polipéptido mutante de la colicina que puede formar canales iónicos con un polipéptido de un anticuerpo anti virus de EB o un polipéptido de un mimético de anticuerpo anti virus de EB, en el que el polipéptido mutante de la colicina que puede formar canales iónicos se obtiene mediante la mutación de los restos de aminoácido G11A, H22G, A26G, V31L y H40D, en la cadena peptídica de la colicina la de tipo silvestre, la secuencia de aminoácidos del polipéptido del anticuerpo anti virus de EB es la misma que la del polipéptido del anticuerpo monoclonal que secreta el hibridoma HB-168 de la ATCC y en el que el polipéptido del mimético de anticuerpo es un péptido conectado de la región CDR1 de la cadena pesada, que une el segmento peptídico de las CDR1-CDR2 de la cadena pesada y la CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo anti virus de EB que secreta el hibridoma HB-168 de la ATCC.
12. El polipéptido frente al tumor provocado por el virus de EB de la reivindicación 11, en el que el polipéptido frente al tumor provocado por el virus de EB tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO. 29.

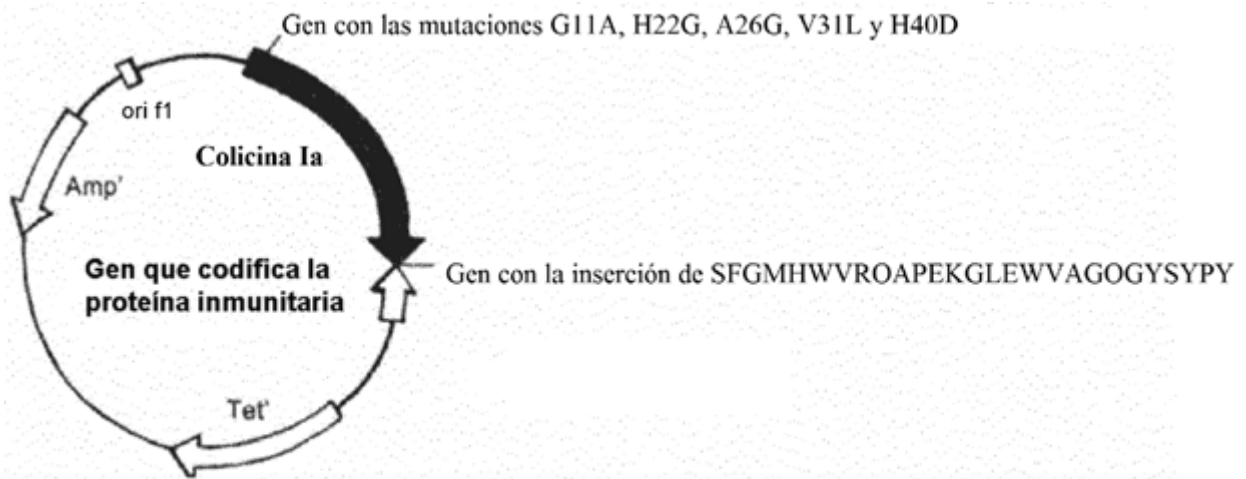


Figura 1

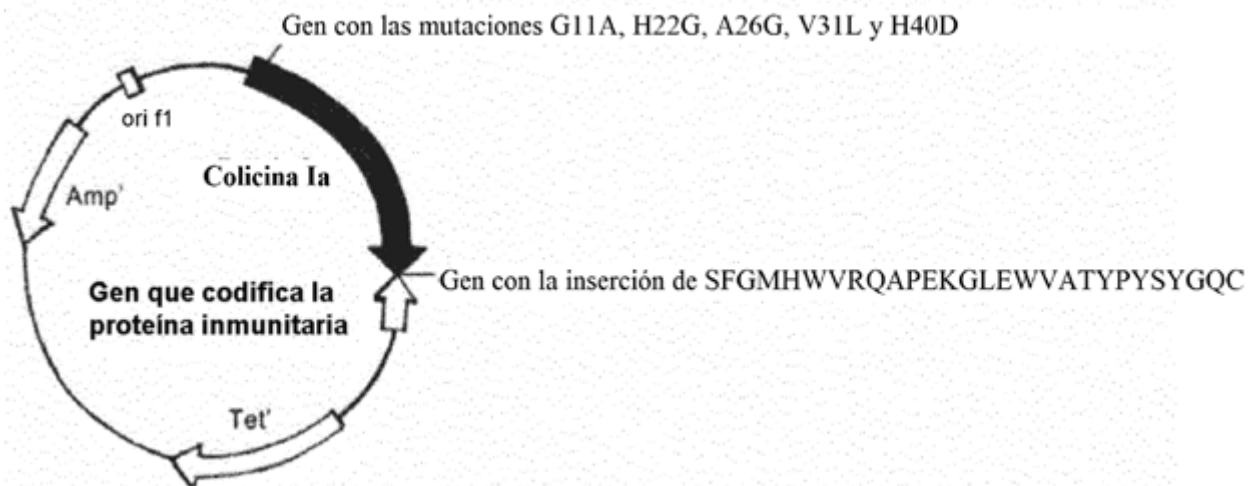


Figura 2

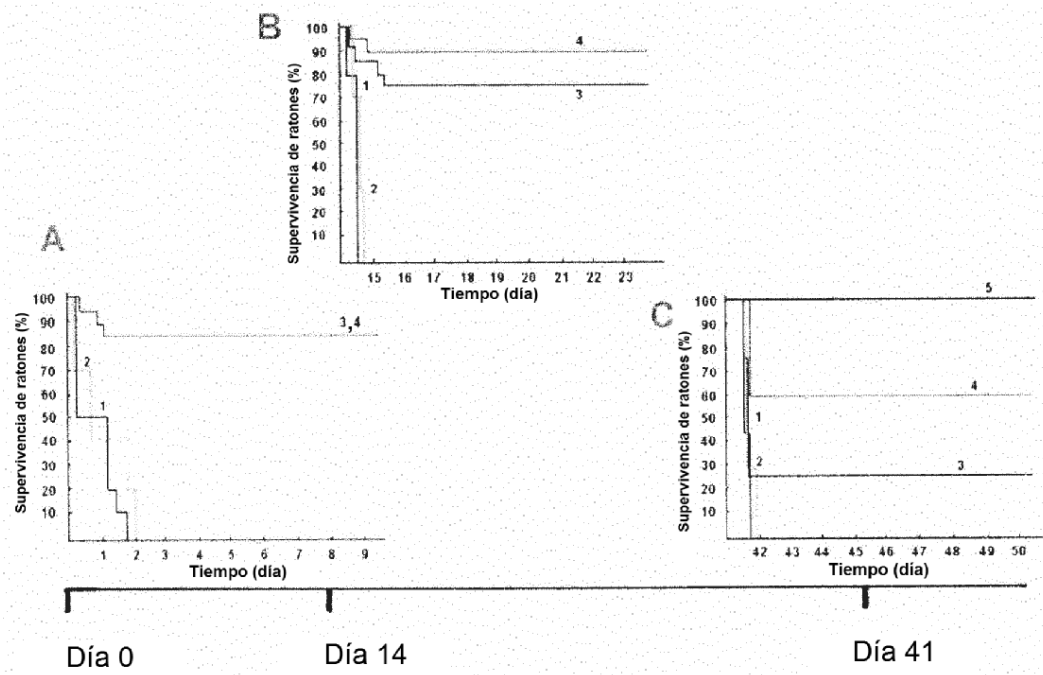


Figura 3

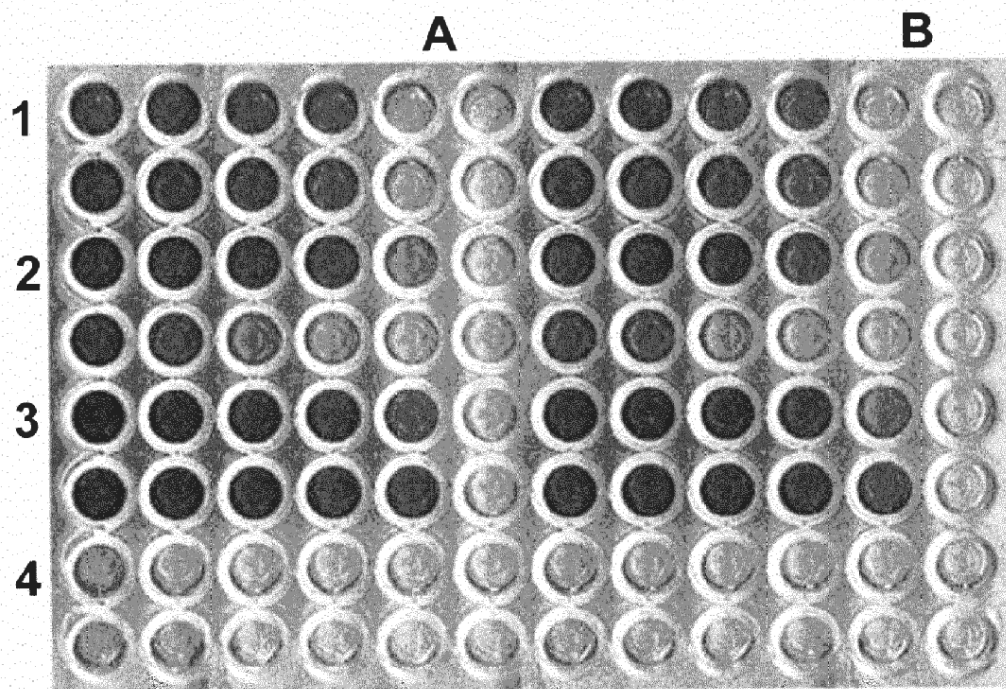


Figura 4

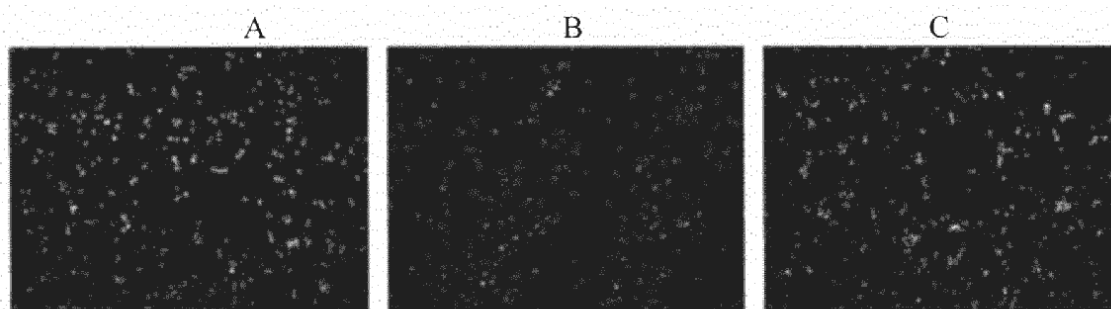


Figura 5

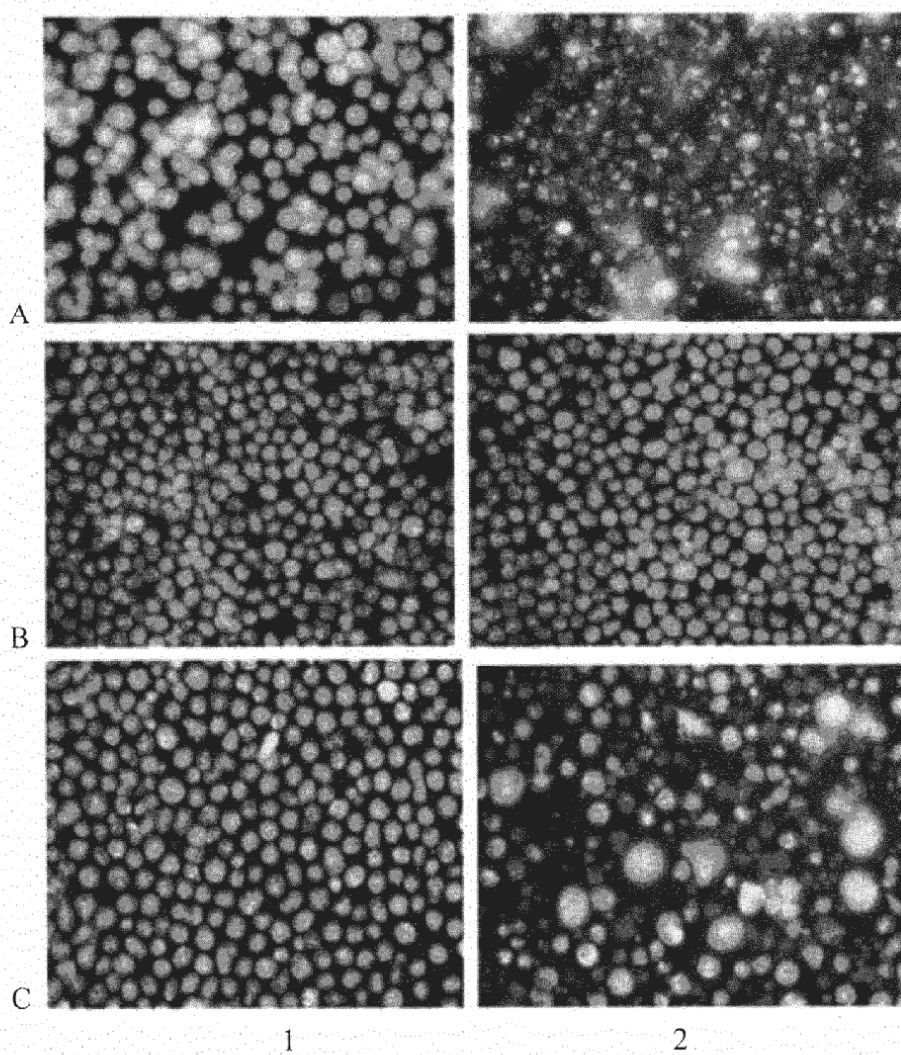


Figura 6

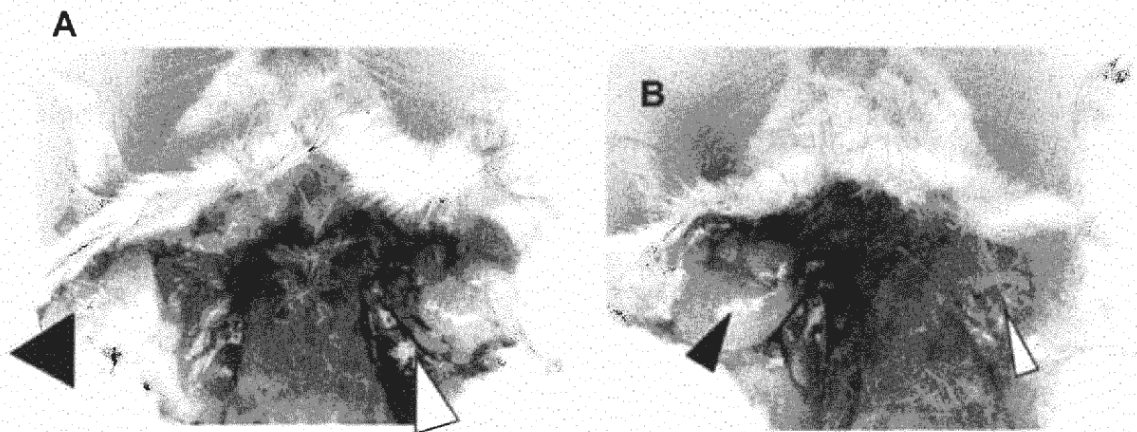


Figura 7

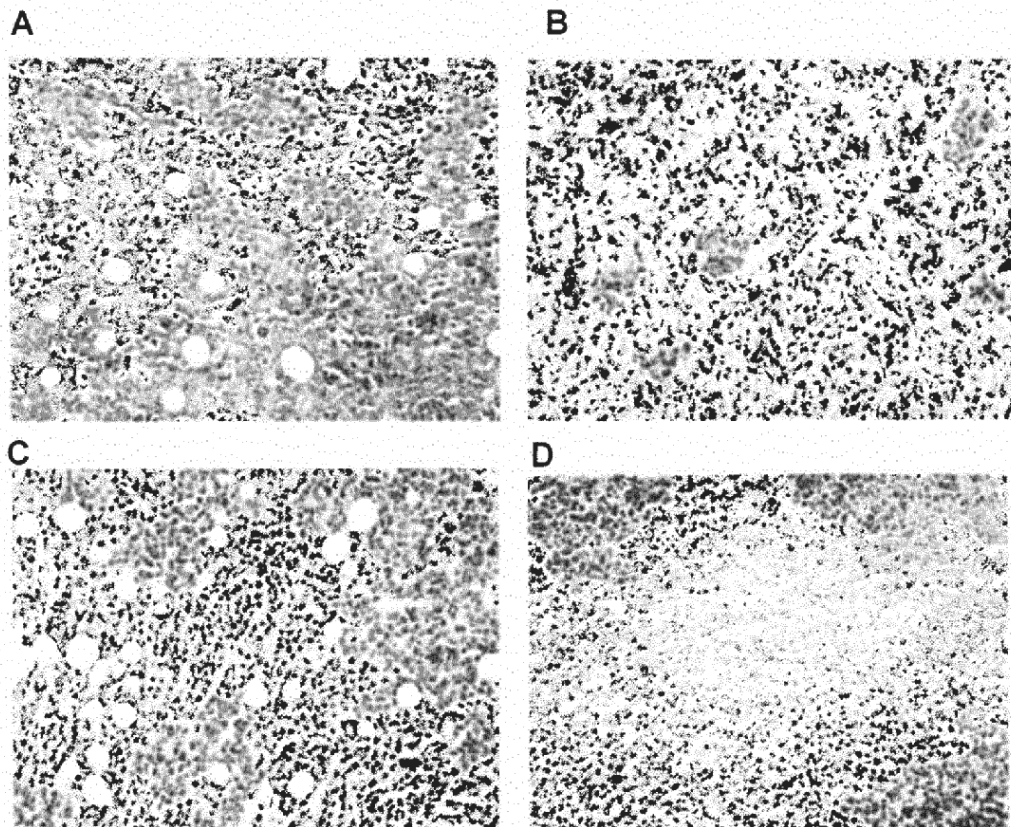


Figura 8

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- WO 2007083175 A [0005]
- US 2006233813 A [0005]
- US 2006193867 A [0005]
- WO ZL200410081446 A [0026]
- EP 10836940 A [0061]
- CN 2010070762 W [0061]
- CN 200910242838 [0061]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **QIU et al.** Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating. *J. Gen. Physiology*, 1996, vol. 107, 313-328 [0002]
- **XIAO-QING QIU et al.** Small antibody mimetics comprising two complementarity-determining regions and a framework region for tumor targeting. *Nature Biotechnology*, 01 August 2007, vol. 25, 921-929 [0004]