

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 416**

51 Int. Cl.:

C07K 14/21 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2012 PCT/US2012/041234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.12.2012 WO12170617**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2012 E 12727074 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2718308**

54 Título: **Exotoxina A de pseudomonas con epítomos de linfocitos T y/o linfocitos B menos inmunogénicos**

30 Prioridad:

09.06.2011 US 201161495085 P
16.09.2011 US 201161535668 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2017

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA, AS
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (100.0%)
Office of Technology Transfer National Institutes
of Health 6011 Executive Boulevard Suite 325
MSC 7660
Bethesda, Maryland 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

**PASTAN, IRA H.;
MAZOR, RONIT;
ONDA, MASANORI;
VASSALL, AARON;
BEERS, RICHARD;
EBERLE, JAIME y
LIU, WENHAI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 635 416 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

Exotoxina A de *Pseudomonas* con epítomos de linfocitos T y/o linfocitos B menos inmunogénicos

5 Referencia cruzada a la solicitud relacionada

Antecedentes de la invención

10 La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) es una toxina bacteriana con actividad citotóxica que puede ser eficaz para destruir o inhibir el crecimiento de células no deseadas, por ejemplo, células cancerosas. En consecuencia, PE puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer. Sin embargo, PE puede ser altamente inmunogénica. En consecuencia, la administración de PE puede estimular una respuesta inmunológica anti-PE que incluye, por ejemplo, la producción de anticuerpos anti-PE y/o linfocitos T, que de forma no deseada neutraliza la actividad citotóxica de PE. La inmunogenicidad de este tipo puede reducir la cantidad de PE que se puede administrar paciente que, a su vez, puede reducir la eficacia de la PE para tratar la enfermedad, por ejemplo, cáncer. Por lo tanto, existe una necesidad de PE mejorada.

Breve resumen de la invención

20 Una realización de la invención proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302, con la condición de que cuando la secuencia de aminoácidos comprenda una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R302, al menos uno de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, y L299 esté sustituido, en la que los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1, y en la que la PE presenta un aumento de la actividad citotóxica y la PE presenta una reducción de la inmunogenicidad en comparación con una PE no sustituida, opcionalmente con una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 y/o una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T dentro de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1, preferentemente en la que la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299 y R302 es una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299 y R302.

35 Otra realización de la divulgación se refiere a una PE que comprende la secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula I:

$$\text{FCS} - \text{R}^1_m - \text{R}^2_p - \text{R}^3_n - \text{dominio III funcional de PE} \\ (\text{Fórmula I})$$

40 en la que:

m, n, y p son, independientemente, 0 o 1;

FCS comprende una secuencia de escisión de furina de restos de aminoácidos, secuencia que se puede escindir con furina;

45 R^1 comprende 1 o más restos de aminoácidos continuos de los restos 285-293 de SEQ ID NO: 1;

R^2 comprende $\text{X}_1\text{VAX}_2\text{X}_3\text{X}_4\text{AAX}_5\text{LSW}$ (SEQ ID NO: 2), en el que X_1 , X_2 , y X_4 son independientemente leucina, alanina, glicina, serina, o glutamina; X_3 es tirosina, alanina, glicina, serina, o glutamina; y X_5 es arginina, alanina, glicina, serina, o glutamina; con la condición de que la PE no comprenda LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3) y que cuando X_5 sea alanina, al menos uno de X_1 , X_2 , X_3 , y X_4 sea alanina, glicina, serina, o glutamina;

50 R^3 comprende 1 o más restos de aminoácidos continuos de los restos 306-394 de SEQ ID NO: 1; y

el dominio III funcional de PE comprende los restos 395-613 de SEQ ID NO: 1, opcionalmente con una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 y/o una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T dentro de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1.

60 Además, otra realización de la invención proporciona una PE que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1; con la condición de que

cuando el resto de aminoácido en la posición Q485 o L516 esté sustituido con alanina, al menos un resto de aminoácido adicional en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 esté sustituido, y

65 cuando el resto de aminoácido en la posición R427, R467, R490, R505, R513, o R551 esté sustituido con alanina, glicina, serina, o glutamina o cuando el resto de aminoácido en la posición R490 esté sustituido con valina, leucina, o isoleucina, al menos un resto de aminoácido adicional en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439,

H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 esté sustituido que no incluye una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina para un resto de aminoácido en la posición R427, R467, R490, R505, R513, o R551 o una sustitución de valina, leucina, o isoleucina para un resto de aminoácido en la posición 490,

5 en la que los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1.

Además, otra realización de la invención proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) que comprende una secuencia de aminoácidos de PE que tiene una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos D463, Y481, y L516 como se define por referencia a la SEQ ID NO: 1, con la condición de que cuando el resto de aminoácido en la posición 516 esté sustituido con alanina, al menos uno de los restos de los aminoácidos D463 e Y481 también esté sustituido, en la que la PE tiene opcionalmente una sustitución adicional de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B, y/o una sustitución adicional de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T, y/o una delección de uno o más restos de aminoácidos continuos de los restos 1-273 y 285-394 como se define mediante la SEQ ID NO: 1.

Las realizaciones adicionales de la invención proporcionan moléculas quiméricas relacionadas, así como ácidos nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células, y composiciones farmacéuticas.

Además, otra realización de la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero que comprende administrar al mamífero la PE, molécula quimérica, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula hospedadora, población de células, o composición farmacéutica de la invención, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Otra realización de la invención proporciona un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula diana que comprende poner en contacto la célula con la PE, molécula quimérica, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula hospedadora, población de células, o composición farmacéutica de la invención, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de la célula diana.

Las realizaciones adicionales de la invención proporcionan métodos para producir la PE de la invención y métodos para producir la molécula quimérica de la invención.

Breve descripción de varias vistas de la figura(s)

35 La Figura 1 es un gráfico que muestra la frecuencia alélica (eje y) de diversos alelos de DR beta 1 (DRB1) de la clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (eje x) en la población mundial (barras sin sombrear) y población base de donantes (barras sombreadas).

40 La Figura 2 A es un gráfico que muestra el número de células formadoras de manchas (SFC) por 1×10^6 células (eje y) lo que indica una respuesta de los linfocitos T03181 Oaph de donantes sin tratamiento previo después de expansión *in vitro* e incubación con medios (M) (no peptídico), combinación de péptidos 3, combinación de péptidos 16, o combinación de péptidos 22 (eje x) tal como se mide mediante ELISpot de interleuquina (IL)-2.

45 La Figura 2B es un gráfico que muestra el número de SFC por 1×10^6 células (eje y) lo que indica una respuesta de los linfocitos T 031810aph de donantes sin tratamiento previo después de incubación sin péptido, combinación de péptidos 3, combinación de péptidos 16, o combinación de péptidos 22 (eje x) sin expansión *in vitro* tal como se mide mediante ELISpot de IL-2.

50 La Figura 3 es un gráfico que muestra el número total de SFC por 1×10^6 células (eje y) con linfocitos T de cada uno de los donantes 1-50 a ningún péptido o a cada una de las combinaciones de péptidos 1-22 (eje x) después de 14 días de expansión *in vitro*. La línea de puntos indica tres veces de fondo.

55 La Figura 4 identifica los péptidos y regiones específicos dentro de los péptidos (áreas sombreadas) a partir de la combinación de péptidos 3 que estimula una respuesta de los linfocitos T a diversas intensidades para diversos donantes.

60 La Figura 5 es un gráfico que muestra la actividad citotóxica (% de control) (eje y) con respecto a la concentración de HA22 de tipo silvestre (un fragmento de anticuerpo anti-CD22 de Fv unido por puente disulfuro conjugado con PE38) (círculos), L297A HA22 (cuadrados), o R302A HA22 (diamantes) (ng/ml) (eje x) en células CA46.

65 La Figura 6A es un gráfico que muestra la respuesta de los linfocitos T para 010710 de donante (SFC por 1×10^6 células) (eje y) después de reestimulación sin péptido, péptido de tipo silvestre (WT15), o R302A (eje y) después de cultivo durante 14 días con HA22 de tipo silvestre (barras sombreadas) o R302A HA22 (barras sin sombrear).

La Figura 6B es un gráfico que muestra la respuesta de los linfocitos T para 111909 de donante (SFC por 1×10^6 células) (eje y) después de reestimulación sin péptido, péptido de tipo silvestre (WT15), o R302A (eje y) después de cultivo durante 14 días con HA22 de tipo silvestre (barras sombreadas) o R302A HA22 (barras sin sombrear).

5 La Figura 7A es un gráfico que muestra la respuesta de los linfocitos T para 031510 de donante (SFC por 1×10^6 células) (eje y) después de estimulación con HA22 (que contiene PE38) (barras sombreadas) o LR RIT (LR) (que contiene los restos de los aminoácidos 274-284 y 395-613 de SEQ ID NO: 1) (barras sin sombrear) y reestimulación con una de las combinaciones de péptidos 1-22 (eje x). Los controles incluían células cultivadas con ceftazidima (CEFT), células sin estimulación con antígeno el día 0 y ninguna estimulación con antígeno el día 14 ("línea M"), y células con estimulación con LMB9 el día 0 y ninguna estimulación con antígeno el día 14 ("sin péptido").

15 La Figura 7B es un gráfico que muestra la respuesta de los linfocitos T para 021610 de donante (SFC por 1×10^6 células) (eje y) después de estimulación con HA22 (que contiene PE38) (barras sombreadas) o LR RIT (LR) (que contiene los restos de los aminoácidos 274-284 y 395-613 de SEQ ID NO: 1) (barras sin sombrear) y reestimulación sin péptido o a cada una de las combinaciones de péptidos 1-22 (eje x). Los controles incluían células cultivadas con ceftazidima (CEFT), células sin estimulación con antígeno el día 0 y ninguna estimulación con antígeno el día 14 ("línea M"), y células con estimulación con LMB9 el día 0 y ninguna estimulación con antígeno el día 14 ("sin péptido").

20 La Figura 7C es un gráfico que muestra la respuesta de los linfocitos T para 101509 de donante (SFC por 1×10^6 células) (eje y) después de estimulación con HA22 (que contiene PE38) (barras sombreadas) o LR RIT (LR) (que contiene los restos de los aminoácidos 274-284 y 395-613 de SEQ ID NO: 1) (barras sin sombrear) y reestimulación sin péptido o a cada una de las combinaciones de péptidos 1-22 (eje x). Los controles incluían células cultivadas con ceftazidima (CEFT), células sin estimulación con antígeno el día 0 y ninguna estimulación con antígeno el día 14 ("línea M"), y células con estimulación con LMB9 el día 0 y ninguna estimulación con antígeno el día 14 ("sin péptido").

30 La Figura 8 identifica los péptidos específicos (áreas sombreadas) de péptidos de las SEQ ID NOs: 102-111 que estimulan una respuesta de los linfocitos T tal como se mide mediante la producción de IL-2 para diversos donantes.

La Figura 9 es un gráfico que muestra el porcentaje acumulativo de las respuestas totales por donante para 50 donantes para cada una de las SEQ ID NOs: 31-141.

35 La Figura 10 es un gráfico que muestra la reactividad de fago anti-PE38 (dominio III) frente a HA22 sustituido de forma puntual. Las celdas de color negro representan menos de un 10 % de reactividad, las celdas en blanco representan más de un 10 % de reactividad, y las celdas de color gris indican no sometido a ensayo. Las sustituciones se ordenan por su ubicación desde el extremo N terminal (a la izquierda) al extremo C terminal (ala derecha).

40 Las Figuras 11A y 11B son gráficos de líneas que muestran los resultados de experimentos de competición que someten a ensayo la concentración de cada una de las inmunotoxinas sustituidas HA22 ("HA," círculos cerrados), HA22-LR ("LR," círculos abiertos), HA22-LO5 ("LO5," triángulos cerrados), HA22-LO6 ("LO6," triángulos abiertos), HA22-LR-8M ("LR8M," cuadrados cerrados), y HA22-LO10 ("LO10," cuadrados abiertos) que reducían el nivel de anticuerpos que reaccionan con HA22 en un 50 % (línea de puntos) en el suero de un primer (Figura 11A) y un segundo (Figura 11B) pacientes que se están sometiendo a ensayos clínicos con HA22.

50 La Figura 12 es un gráfico que muestra el porcentaje de unión de anticuerpos a HA22, HA22-LR-8M, HA22-LO10 (HA22-LRLO10), o HA22-LRLO10R en los sueros de pacientes tratados usando PE38.

Descripción detallada de la invención

55 La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") es una toxina bacteriana (peso molecular 66 kD) secretada por *Pseudomonas aeruginosa*. La secuencia de PE de tipo silvestre, nativa (SEQ ID NO: 1) se expone en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.602.095. La PE de tipo silvestre, nativa incluye tres dominios estructurales que contribuyen a la citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) media la unión celular con el dominio II (aminoácidos 253-364) media la translocación en el citosol, y el dominio III (aminoácidos 400-613) media la ribosilación de ADP del factor de elongación 2. Aunque se considera que el límite estructural del dominio III de PE comienza en el resto 400, se contempla que el dominio III puede requerir un segmento del dominio Ib para retener la actividad de ribosilación de ADP. Por consiguiente, el dominio funcional III se define como los restos 395-613 de PE. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) permanece sin definir. Sin desea quedar ligado por ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree que la actividad citotóxica de PE se produce a través de la inhibición de la síntesis de proteínas en células eucariotas, por ejemplo, mediante la inactivación de la ribosilación de ADP del factor de elongación 2 (EF-2).

En el presente documento, las sustituciones de PE se definen por referencia a la secuencia de aminoácidos de PE. Por lo tanto, en el presente documento las sustituciones de PE se describen por referencia al resto de aminoácido presente en una posición en particular, seguido del aminoácido con el que se ha reemplazado ese resto en la sustitución en particular que se está discutiendo. En este sentido, en el presente documento las posiciones de la secuencia de aminoácidos de una realización en particular de una PE se refieren a las posiciones de la secuencia de aminoácidos de la realización en particular o a las posiciones como se definen mediante la SEQ ID NO: 1. Cuando las posiciones son como se define mediante la SEQ ID NO: 1, entonces las posiciones reales de la secuencia de aminoácidos de una realización en particular de una PE se definen con respecto a las posiciones correspondientes de la SEQ ID NO: 1 y pueden representar diferentes números de la posición del resto que los números de la posición del resto de SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, por ejemplo, la sustituciones se refieren a una sustitución de un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una realización en particular de una PE que corresponde a la posición indicada de la secuencia del aminoácido 613 de SEQ ID NO: 1 con la comprensión de que las posiciones reales en las respectivas secuencias de aminoácidos pueden ser diferentes. Por ejemplo, cuando las posiciones son como se define mediante la SEQ ID NO: 1, el término "R490" se refiere a la arginina normalmente presente en la posición 490 de la SEQ ID NO: 1, "R490A" indica que la arginina normalmente presente en la posición 490 de la SEQ ID NO: 1 está sustituida con una alanina, mientras que "K590Q" indica que la lisina normalmente presente en la posición 590 de SEQ ID NO: 1 se ha reemplazado por una glutamina. En el caso de múltiples sustituciones en dos o más posiciones, las dos o más sustituciones pueden ser iguales o diferentes, es decir, cada resto de aminoácido de los dos o más restos de los aminoácidos que se están sustituyendo puede estar sustituido con el mismo o diferente resto de aminoácido a menos que se indique explícitamente de otro modo.

Los términos "exotoxina de *Pseudomonas*" y "PE" como se usan en el presente documento incluyen PE que se ha modificado a partir de la proteína nativa para reducir o para eliminar la inmunogenicidad. Las modificaciones de este tipo pueden incluir, pero no se limitan a, eliminación del dominio la, diversas deleciones de aminoácidos en los dominios Ib, II, e III, sustituciones de un solo aminoácido y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo terminal tales como DEL y REDL (SEQ ID NO: 7). Véase Siegall *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264: 14256-14261 (1989). Tales PE modificadas se pueden modificar adicionalmente para que incluyan cualquiera de la sustitución o sustituciones de la invención para uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T y/o linfocitos B descritos en el presente documento. En una realización, la PE modificada puede ser un fragmento citotóxico de PE de tipo silvestre, nativa. Los fragmentos citotóxicos de PE pueden incluir los que son citotóxicos con o sin posterior procesamiento proteolítico o de otro tipo en la célula diana (por ejemplo, como una proteína o pre-proteína). En una realización preferente, el fragmento citotóxico de PE retiene al menos aproximadamente un 20 %, preferentemente al menos aproximadamente un 40 %, más preferentemente de aproximadamente 50 %, incluso más preferentemente un 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, y aún más preferentemente un 95 % de la citotoxicidad de la PE nativa. En realizaciones particularmente preferentes, el fragmento citotóxico tiene al menos la citotoxicidad de la PE nativa, y que preferentemente presenta un aumento de la citotoxicidad en comparación con la PE nativa.

La PE modificada que reduce o elimina la inmunogenicidad incluye, por ejemplo, PE4E, PE40, PE38, PE25, PE38QQR, PE38KDEL, y PE35. En una realización, la PE puede ser cualquiera de PE4E, PE40, PE38, PE25, PE38QQR (en las que PE38 tiene la secuencia QQR añadida al extremo C-terminal), PE38KDEL (en la que PE38 tiene la secuencia KDEL (SEQ ID NO: 5) añadida al extremo C-terminal), PE-LR (resistencia a la degradación lisosómica), y PE35.

En una realización, la PE se ha modificado para reducir la inmunogenicidad mediante deleción del dominio la como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.892.827. La PE también se puede modificar mediante sustitución de ciertos restos del dominio la. En una realización, la PE puede ser PE4E, que es una PE sustituida en la que el dominio la está presente pero en la que los restos básicos del dominio la en las posiciones 57, 246, 247, y 249 están sustituidos con restos ácidos (por ejemplo, ácido glutámico), como se desvela en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.512.658.

PE40 es un derivado truncado de PE (Pai *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 88: 3358-62 (1991) y Kondo *et al.*, *Biol. Chem.*, 263: 9470-9475 (1988)). PE35 es un fragmento carboxilo-terminal de 35 kD de PE en el que los restos de los aminoácidos 1-279 han experimentado deleción y la molécula comienza con una Met en la posición 280 seguida de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de la PE nativa. PE35 y PE40 se desvelan, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.602.095 y 4.892.827. PE25 contiene el fragmento de 11 restos de dominio II y all del dominio III. En algunas realizaciones, la PE contiene solamente el dominio III.

En una realización preferente, la PE es PE38. PE38 contiene los dominios de translocación y ribosilación de ADP de PE pero no la parte de unión a la célula (Hwang J. *et al.*, *Cell*, 48: 129-136 (1987)). PE38 es una pro-proteína de PE truncada formada por los aminoácidos 253-364 y 381-613 (SEQ ID NO: 144) que se activa en su forma citotóxica después de su procesamiento dentro de una célula (véase por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.608.039, y Pastan *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1333: C1-C6 (1997)).

En otra realización preferente, la PE es PE-LR. PE-LR contiene una deleción del dominio II exento para una secuencia de escisión de furina (FCS) que corresponde a los restos de los aminoácidos 274-284 de SEQ ID NO: 1

(RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 8)) y una delección de los restos de los aminoácidos 365-394 del dominio Ib. Por lo tanto, PE-LR contiene los restos de los aminoácidos 274-284 y 395-613 de SEQ ID NO: 1. PE-LR se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2009/032954. Además, la PE-LR puede, opcionalmente, comprender un péptido de unión a GGS entre las FCS y los restos de los aminoácidos 395-613 de SEQ ID NO: 1.

5 Como se ha indicado anteriormente, como alternativa o adicionalmente, algunos o todos del dominio Ib deben experimentar delección con las partes restantes unidas mediante un puente o directamente mediante un enlace peptídico. Como alternativa o adicionalmente, algunas de las partes amino del dominio Ib pueden experimentar delección. Como alternativa o adicionalmente, el extremo C-terminal puede contener la secuencia nativa de los
10 restos 609-613 (REDLK) (SEQ ID NO: 6), o puede contener una variación que puede mantener la capacidad de la PE para translocarse en el citosol, tal como KDEL (SEQ ID NO: 5) o REDL (SEQ ID NO: 7), y repeticiones de estas secuencias. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.854.044; 5.821.238; y 5.602.095 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 1999/051643. Cualquier forma de PE en la que la inmunogenicidad se haya eliminado o reducido se puede usar en combinación con cualquiera de la sustitución o
15 sustituciones de la invención para uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T y/o linfocitos B descrito en el presente documento siempre y cuando siga siendo capaz de citotoxicidad de células diana, por ejemplo, mediante translocación y ribosilación de EF-2 en una célula diana.

Una realización de la invención proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE), que incluye cualquier PE modificada a partir de la proteína nativa como se describe en el presente documento, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302, con la condición de que cuando la secuencia de aminoácidos comprenda una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R302, al menos un resto de aminoácido adicional esté sustituido, en la que los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1, y en la que la PE presenta un aumento de la actividad citotóxica y la PE presenta una reducción de la inmunogenicidad en comparación con una PE no sustituida, opcionalmente con una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 y/o una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T dentro de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1. Preferentemente, la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T es una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, Y470, I471, A472, P475, A476, L477, I493, R494, N495, L498, L499, R500, V501, Y502, V503, R505, L508, P509, R551, L552, T554, I555, L556, y W558.

Otra realización de la invención proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE), que incluye cualquier PE modificada a partir de la proteína nativa como se describe en el presente documento, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302, con la condición de que cuando la secuencia de aminoácidos comprenda una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R302, al menos uno de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, y L299 esté sustituido, en la que los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1, y en la que la PE presenta un aumento de la actividad citotóxica y la PE presenta una reducción de la inmunogenicidad en comparación con una PE no sustituida, opcionalmente con una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 y/o una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T dentro de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1. Se ha descubierto que los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302 están situados dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de PE. Por lo tanto, una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302 puede, de forma ventajosa, eliminar uno o más epítomo(s) de linfocitos T. Por consiguiente, las PE de la invención pueden, de forma ventajosa, ser menos inmunogénica es que una PE sin sustituir (por ejemplo, de tipo silvestre).

La sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302 puede ser una sustitución de cualquier resto de aminoácido para uno o más de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302. En una realización de la invención, la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302 es una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299, y R302.

En una realización de la invención, la PE comprende $X_1VAX_2X_3X_4AAX_5LSW$ (SEQ ID NO: 2), en la que X_1 , X_2 , y X_4 son independientemente leucina, alanina, glicina, serina, o glutamina; X_3 es tirosina, alanina, glicina, serina, o glutamina; y X_5 es arginina, alanina, glicina, serina, o glutamina; con la condición de que la PE no comprenda LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3) y que cuando X_5 sea alanina, al menos uno de X_1 , X_2 , X_3 , y X_4 sea alanina, glicina, serina, o glutamina.

65 Otra realización de la divulgación se refiere a una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) que comprende una secuencia de aminoácidos de PE que tiene una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos D463, Y481, y L516

como se define por referencia a la SEQ ID NO: 1, con la condición de que cuando el resto de aminoácido en la posición 516 esté sustituido con alanina, al menos uno de los restos de los aminoácidos D463 e Y481 esté sustituido, en la que la PE tiene opcionalmente una sustitución adicional de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B y/o una sustitución adicional de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T, y/o una delección de uno o más restos de aminoácidos continuos de los restos 1-273 y 285-394 como se define mediante la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos D463, Y481, y L516 es una sustitución de, independientemente, alanina, glicina, serina, o glutamina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos D463, Y481, y L516. Se ha descubierto que los restos de los aminoácidos D463, Y481, y L516 están situados dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de PE. Por lo tanto, una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos D463, Y481, y L516 puede, de forma ventajosa, eliminar uno o más epítomo(s) de linfocitos T y/o linfocitos B. Por consiguiente, las PE de la invención pueden, de forma ventajosa, ser menos inmunogénicas que una PE sin sustituir (por ejemplo, de tipo silvestre).

En una realización de la invención, la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B es una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E282, E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331, Q332, D403, D406, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R490, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, Q592, y L597, como se define por referencia a la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, la sustitución adicional dentro de uno o más epítomos de linfocitos B es una sustitución de, independientemente, alanina, glicina, o serina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505, y R538. En una realización especialmente preferente, la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos D463, Y481, y L516 es una sustitución de alanina en lugar del resto del aminoácido D463 y la sustitución adicional dentro de uno o más epítomos de linfocitos B es: (a) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R427; (b) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R458; (c) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R467; (d) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R490; (e) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R505; y (f) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R538, como se define por referencia a la SEQ ID NO: 1.

Además de la sustitución o sustituciones para uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T y/o linfocitos B de PE descritos en el presente documento, la PE de la invención también puede incluir, opcionalmente, una sustitución o sustituciones adicionales para uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1. En este sentido, en una realización de la invención, la PE tiene una sustitución de uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1. En una realización preferente de la invención, la sustitución de uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 incluye una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina para uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1. La sustitución o sustituciones dentro de uno o más epítomos de linfocitos B puede, de forma ventajosa, reducir adicionalmente la inmunogenicidad mediante la eliminación de uno o más epítomos de linfocitos B. La sustitución o sustituciones pueden estar situadas dentro de cualquier epítomo de linfocitos B de PE adecuado. Los epítomos de linfocitos B a modo de ejemplo se desvelan, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional WO 2007/016150, WO 2009/032954, y WO 2011/032022. En una realización preferente, la sustitución de uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina, independientemente, en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos E282, E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331, Q332, D403, D406, R412, R427, E431, R432, R458, D461, D463, R467, Y481, R490, R505, R513, L516, E522, R538, E548, R551, R576, K590, Q592, y L597, en la que los restos de los aminoácidos E282, E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331, Q332, D403, D406, R412, R427, E431, R432, R458, D461, D463, R467, Y481, R490, R505, R513, L516, E522, R538, E548, R551, R576, K590, Q592, y L597 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1. En una realización particularmente preferente, la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina, glicina, o serina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590, y Q592. En una realización especialmente preferente, la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es: (a) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido D406; (b) una sustitución de glicina para el resto del aminoácido R432; (c) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R467; (d) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R490; (e) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R513; (f) una sustitución de serina para el resto del aminoácido E548; (g) una sustitución de serina para el resto del aminoácido K590; y (h) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido Q592.

En una realización de la invención, la PE comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 sola o en combinación con cualquiera de las otras sustituciones descritas en el presente documento. En una realización de la invención, la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, Y470, I471, A472, P475, A476, L477, I493, R494, N495, L498, L499, R500, V501, Y502, V503, R505, L508, P509, R551, L552, T554, I555, L556, y W558.

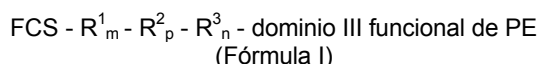
La sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 puede ser una sustitución de cualquier resto de aminoácido en lugar de un resto de aminoácido en una cualquiera o más de las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1. La sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 puede incluir, por ejemplo, una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos en la posición 421, 422, 423, 425, 427, 429, 439, 440, 443, 444, 446, 447, 450, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 551, 552, 554, 555, 556, y 558 de SEQ ID NO: 1. En una realización preferente, la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, Y470, I471, A472, P475, A476, L477, I493, R494, N495, L498, L499, R500, V501, Y502, V503, R505, L508, P509, R551, L552, T554, I555, L556, y W558. Una o más sustituciones en uno o más epítopos de linfocitos T situados en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de PE como se define por referencia a la SEQ ID NO: 1 pueden reducir adicionalmente la inmunogenicidad de PE. En una realización, la secuencia de aminoácidos no tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones 427, 467, 485, 490, 505, 513, 516, y 551.

En otra realización de la invención, la PE comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1; con la condición de que cuando el resto de aminoácido en la posición Q485 o L516 esté sustituido con alanina, al menos un resto de aminoácido adicional está sustituido, y cuando el resto de aminoácido en la posición R427, R467, R490, R505, R513, o R551 está sustituido con alanina, glicina, serina, o glutamina o cuando el resto de aminoácido en la posición R490 está sustituido con valina, leucina, o isoleucina, al menos un resto de aminoácido adicional está sustituido que no incluya una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina para un resto de aminoácido en la posición 282, 285, 290, 313, 314, 319, 324, 327, 331, 332, 403, 406, 412, 427, 431, 432, 458, 461, 467, 490, 505, 513, 522, 538, 548, 551, 576, 590, 592, o 597 o una sustitución de valina, leucina, o isoleucina para un resto de aminoácido en la posición 490, en la que los restos de los aminoácidos 282, 285, 290, 302, 313, 314, 319, 324, 327, 331, 332, 403, 406, 412, 427, 431, 432, 458, 461, 463-519, 522, 538, 548, 551, 576, 590, 592, y 597 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1.

En otra realización de la invención, la PE comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1; con la condición de que cuando el resto de aminoácido en la posición Q485 o L516 esté sustituido con alanina, al menos un resto de aminoácido adicional en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 está sustituido, y cuando el resto de aminoácido en la posición R427, R467, R490, R505, R513, o R551 está sustituido con alanina, glicina, serina, o glutamina o cuando el resto de aminoácido en la posición R490 está sustituido con valina, leucina, o isoleucina, al menos un resto de aminoácido adicional en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 está sustituido que no incluya una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina para un resto de aminoácido en la posición R427, R467, R490, R505, R513, R551 o una sustitución de valina, leucina, o isoleucina para un resto de aminoácido en la posición R490, en la que los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1.

La PE comprende una o más sustituciones que aumentan la citotoxicidad como se desvela, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2007/016150. En este sentido, una realización de la invención proporciona PE con una sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítopos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 y la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítopos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de valina, leucina, o isoleucina en lugar del resto del aminoácido R490, en la que el resto del aminoácido R490 se define por referencia a la SEQ ID NO: 1. En una realización de la invención, la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones 313, 327, 331, 332, 431, 432, 505, 516, 538, y 590 definidos por referencia a la SEQ ID NO: 1 con alanina o glutamina puede proporcionar una PE con un aumento de la citotoxicidad como se desvela, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2007/016150. El aumento de la actividad citotóxica y la disminución de inmunogenicidad se pueden producir de forma simultánea, y no son mutuamente exclusivas. Las sustituciones que tanto aumentan la actividad citotóxica como que disminuyen la inmunogenicidad, tales como las sustituciones de R490 con glicina o, más preferentemente, alanina, son especialmente preferentes.

En una realización de la divulgación, la PE comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula I:



5 en la que:

m, n, y p son, independientemente, 0 o 1;

FCS comprende una secuencia de escisión de furina de restos de aminoácidos, secuencia que se puede escindir con furina;

R¹ comprende 1 o más restos de aminoácidos continuos de los restos 285-293 de SEQ ID NO: 1;

R² comprende X₁VAX₂X₃X₄AAX₅LSW (SEQ ID NO: 2), en la que X₁, X₂, y X₄ son independientemente leucina, alanina, glicina, serina, o glutamina; X₃ es tirosina, alanina, glicina, serina, o glutamina; y X₅ es arginina, alanina, glicina, serina, o glutamina; con la condición de que la PE no comprenda LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3) y que cuando X₅ sea alanina, al menos uno de X₁, X₂, X₃, y X₄ sea alanina, glicina, serina, o glutamina;

R³ comprende 1 o más restos de aminoácidos continuos de los restos 306-394 de SEQ ID NO: 1; y

el dominio III funcional de PE comprende los restos 395-613 de SEQ ID NO: 1 opcionalmente con una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 y/o una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T dentro de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1. En una realización, la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556, y W558 de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, Y470, I471, A472, P475, A476, L477, I493, R494, N495, L498, L499, R500, V501, Y502, V503, R505, L508, P509, R551, L552, T554, I555, L556, y W558.

En una realización de la divulgación, m, n, y/o p de Fórmula I son 0. En una realización de la invención, cuando m, n, y p son cada uno 0, la PE de Fórmula I puede comprender adicionalmente un péptido de unión a GGS entre FCS y el dominio III funcional de PE.

Sin quedar ligado por ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree que las PE que contienen la secuencia de escisión de furina (FCS) experimentan procesamiento proteolítico dentro de las células diana, activando de ese modo la actividad citotóxica de la toxina. La FCS de las PE de la invención puede comprender cualquier secuencia de escisión de furina adecuada de los restos de los aminoácidos, secuencia que se puede escindir con furina. Las secuencias de escisión de furina a modo de ejemplo se describen en Duckert *et al.*, *Protein Engineering, Design & Selection*, 17 (1): 107-112 (2004) y en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2009/032954. En una realización de la invención, la FCS comprende los restos 274-284 de SEQ ID NO: 1 (es decir, RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 8)), en la que la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina para el resto del aminoácido E282 de SEQ ID NO: 1. Otras secuencias de aminoácidos de FCS adecuadas incluyen, pero no se limitan a: R-X₁-X₂-R, en la que X₁ es cualquier aminoácido de origen natural y X₂ es cualquier aminoácido de origen natural (SEQ ID NO: 9), RKKR (SEQ ID NO: 10), RRRR (SEQ ID NO: 11), RKAR (SEQ ID NO: 12), SRVARS (SEQ ID NO: 13), TSSRKRRFW (SEQ ID NO: 14), ASRRKARSW (SEQ ID NO: 15), RRVKCRFW (SEQ ID NO: 16), RNVVRRDW (SEQ ID NO: 17), TRAVRRRSW (SEQ ID NO: 18), RQPR (SEQ ID NO: 19), RHRQPRGW (SEQ ID NO: 20), RHRQPRGWE (SEQ ID NO: 21), FIRQPRGWEQ (SEQ ID NO: 22), RQPRGWE (SEQ ID NO: 23), RHRKRGWEQL (SEQ ID NO: 24), RSKR (SEQ ID NO: 25), RHRKRGW (SEQ ID NO: 26), HRKRGWE (SEQ ID NO: 27), RSKRGWEQL (SEQ ID NO: 28), HRKRGWEQL (SEQ ID NO: 29), RHRKR (SEQ ID NO: 30), y R-X₁-X₂-R, en la que X₁ es cualquier aminoácido de origen natural y X₂ es arginina o lisina (SEQ ID NO: 4).

En una realización de la divulgación, m de Fórmula I es 1 y R¹ de Fórmula I comprende los restos 285-293 de SEQ ID NO: 1, en los que la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 incluye una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina para el resto del aminoácido E285 y/o P290 de SEQ ID NO: 1.

En otra realización de la divulgación, n de Fórmula I es 1 y R³ de Fórmula I comprende los restos 306-394 de SEQ ID NO: 1, en los que la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 incluye una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina para uno o más de los restos de los aminoácidos R313, N314, P319, D324, E327, E331, y Q332 de SEQ ID NO: 1.

Además, en otra realización de la invención, el dominio III funcional de PE comprende los restos 395-613 de SEQ ID NO: 1, en los que la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 incluye una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina para uno o más de los restos de los aminoácidos D403, D406, R412, R427, E431, R432, R458, D461, D463, R467, Y481, R490, R505, R513, L516, E522, R538, E548, R551, R576, K590, Q592, y L597 de SEQ ID NO: 1. En una realización preferente de la invención, el dominio III funcional de PE comprende SEQ ID NO: 142. En una realización especialmente preferente de la invención, el

dominio III funcional de PE comprende SEQ ID NO: 143.

La PE de la invención es menos inmunogénica que una PE no sustituida de acuerdo con la invención si la respuesta inmunológica a la PE de la invención disminuye, de forma cuantitativa o de forma cualitativa, en comparación con la respuesta inmunológica a una PE no sustituida. Una disminución cuantitativa de la inmunogenicidad incluye una disminución de la magnitud o grado de la respuesta inmunológica. La magnitud o grado de inmunogenicidad se pueden medir sobre la base de cualquier número de parámetros conocidos, tales como una disminución del nivel de producción de citoquina (por ejemplo, citoquina específica de antígeno) (concentración de citoquina), una disminución en el número de linfocitos activados (por ejemplo, proliferación de linfocitos (por ejemplo, linfocitos específicos de antígeno)) o reclutados, y/o una disminución en la producción de anticuerpos (anticuerpos específicos de antígeno), etc. Una disminución cualitativa de la inmunogenicidad incluye cualquier cambio en la naturaleza de la respuesta inmunológica que hace que la respuesta inmunológica sea menos eficaz en la mediación de la reducción de la actividad citotóxica de la PE. En la técnica se conocen métodos para medir la inmunogenicidad. Por ejemplo, la medición de los tipos y niveles de citoquina producidos pueden medir la inmunogenicidad. Como alternativa o adicionalmente, la medición de la unión de PE a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos previamente expuestos a PE) y/o la medición de la capacidad de la PE para inducir anticuerpos se administran a un mamífero (por ejemplo, seres humanos, ratones, y/o ratones en los que el sistema inmunitario está sustituido con un sistema inmunitario de ser humano) pueden medir la inmunogenicidad. Una PE menos inmunogénica se puede caracterizar mediante una disminución en la producción de citoquinas tal como uno cualquiera o más de IFN- γ , TNF- α , y granzima B, y/o una reducción de la estimulación de una respuesta inmunitaria mediada por células, tal como una disminución en la proliferación y activación de linfocitos T y/o macrófagos específicos para PE en comparación con la obtenida con una PE no sustituida. Como alternativa o adicionalmente, la PE menos inmunogénica se puede caracterizar mediante un aumento en la producción de TGF-beta y/o IL-10 en comparación con la obtenida con una PE no sustituida. En una realización preferente, la reducción de la inmunogenicidad se caracteriza por una cualquiera o más de una disminución en la estimulación de linfocitos T, una disminución en la proliferación de linfocitos T, y disminución en la secreción de IFN- γ de linfocitos T y/o granzima B. Como alternativa o adicionalmente, una PE menos inmunogénica se puede caracterizar por una disminución en la estimulación y/o activación de linfocitos B específicos para PE en comparación con la obtenida con una PE no sustituida. Por ejemplo, la PE menos inmunogénica se puede caracterizar por una disminución en la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas que secretan anticuerpos y/o células de memoria en comparación con la obtenida con una PE no sustituida. La reducción de la inmunogenicidad se puede caracterizar mediante una cualquiera o más de una disminución de la estimulación de linfocitos B, una disminución de la proliferación de linfocitos B, y una disminución en la secreción de anticuerpos anti-PE. La disminución cualitativa y cuantitativa de la inmunogenicidad se puede producir de forma simultánea y no son mutuamente exclusivas.

Alguien con la experiencia habitual en la materia observará rápidamente que las PE de la invención se pueden modificar en cualquier número de formas, de modo que la eficacia terapéutica o profiláctica de las PE de la invención aumenta a través de la modificación. Por ejemplo, las PE de la invención se pueden conjugar o fusionar ya sea directa o indirectamente a través de un conector a un resto de direccionamiento. En este sentido, una realización de la invención proporciona una molécula quimérica que comprende (a) un resto de direccionamiento conjugado o fusionado con (b) cualquiera de las PE de la invención descritas en el presente documento. La práctica de la conjugación de compuestos, por ejemplo, las de la PE invención, a restos de direccionamiento se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Wadwa *et al.*, *J. Drug Targeting*, 3: 111 (1995), y en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.087.616.

El término "resto de direccionamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce y se une de forma específica a un marcador de superficie celular, de modo que el resto de direccionamiento dice la administración de la PE de la invención a una población de células en cuya superficie se expresa el receptor. Los restos de direccionamiento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales), o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, y cualquier otro ligando natural o no natural.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos completos (también conocidos como "intactos") de porciones de unión antígeno de los mismos que retienen el reconocimiento y la capacidad de unión al antígeno. El anticuerpo o porciones de unión a antígeno del mismo pueden ser un anticuerpo de origen natural o porción de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo aislados y/o purificados a partir de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. El anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo pueden estar en forma monomérica o polimérica. Además, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo pueden tener cualquier nivel de afinidad o aidez hacia el marcador de superficie celular. De forma deseable, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo es específico para el marcador de superficie celular, de modo que existe una reacción cruzada mínima con otros péptidos o proteínas.

El anticuerpo puede ser monoclonal o policlonal y de cualquier isotipo, por ejemplo, IgM, IgG (por ejemplo, IgG, IgG2, IgG3 o IgG4), IgD, IgA o IgE. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo o fragmentos variables de una sola cadena (Fvs) de un anticuerpo frente a un marcador de superficie de célula diana

se pueden injertar o modificar mediante ingeniería en un anticuerpo de elección para conferir una especificidad para el marcador de superficie de la célula diana con respecto a ese anticuerpo. Por ejemplo, las CDR de un anticuerpo frente a un marcador de superficie de la célula diana se pueden injertar sobre un armazón de anticuerpo humano de una estructura tridimensional conocida (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional WO 1998/045322 y WO 1987/002671; los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.859.205; 5.585.089; y 4.816.567; Publicación de Solicitud de Patente Europea N.º 0173494; Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522 (1986); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534 (1988), Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323 (1988); y Winter y Milstein, *Nature*, 349: 293 (1991)) para formar un anticuerpo que pueda producir poca o ninguna respuesta inmunológica cuando se administra a un ser humano. En una realización preferente, el resto de direccionamiento es un anticuerpo monoclonal.

La porción de unión a antígeno puede ser cualquier porción que tenga al menos un sitio de unión al antígeno, tal como, por ejemplo, las regiones variables o las CDR del anticuerpo intacto. Los ejemplos de porciones de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, una cadena pesada, una cadena ligera, una región variable o constante de una cadena pesada o ligera, un fragmento variable de una sola cadena (scFv), o un fragmento de Fc, Fab, Fab', Fv, o F(ab)₂'; anticuerpos de un solo dominio (véase, por ejemplo, Wesolowski, *Med Microbiol Immunol.*, 198 (3): 157-74 (2009); Saerens *et al.*, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 8(5):6 00-8 (2008); Harmsen y de Haard, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77 (1): 13-22 (2007), anticuerpos estabilizados por la hélice (véase, por ejemplo, Arndt *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 312: 221-228 (2001); triacuerpos; diacuerpos (Publicación de Solicitud de Patente Europea N.º 0404097; Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 1993/011161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993)); moléculas de anticuerpo de una sola cadena ("scFvs", véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.888.773); anticuerpos estabilizados por disulfuro ("dsFvs", véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.747.654 y 6.558.672), y anticuerpos de dominio ("dAbs", véase, por ejemplo, Holt *et al.*, *Trends Biotech.*, 21 (11): 484-490 (2003), Ghahroudi *et al.*, *FEBS Lett.*, 414: 521-526 (1997) Lauwereys *et al.*, *EMBO J* 17: 3512- 3520 (1998), Reiter *et al.*, *J. Mol. Biol.* 290: 685-698 (1999); y Davies y Riechmann, *Biotechnology*, 13: 475-479 (2001)).

En la técnica se conocen métodos de ensayo de anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos para la capacidad para unirse a cualquier marcador de superficie celular e incluyen cualquier ensayo de unión de anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway *et al.*, mencionado continuación, y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2002/0197266 A1).

En la técnica se conocen métodos adecuados para preparar anticuerpos. Por ejemplo, los métodos convencionales de hibridoma se describen, por ejemplo, en Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow y Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), y C.A. Janeway *et al.* (eds.), *Immunobiology*, 5ª Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Como alternativa, en la técnica se conocen otros métodos, tales como métodos de EBV-hibridoma (Haskard y Archer, *J. Immunol. Methods*, 74 (2), 361-67 (1984), y Roder *et al.*, *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)), y sistemas de expresión de vectores bacteriófagos (véase, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science*, 246, 1275-81 (1989)). Además, los métodos para producir anticuerpos en animales no humanos se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.545.806, 5.569.825, and 5.714.352, y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2002/0197266 A1.

La presentación de fagos también se puede usar para generar el anticuerpo que se puede usar en las moléculas químicas de la invención. En este sentido, se pueden generar bibliotecas de fagos que codifican dominios variables (V) de unión a antígeno de anticuerpos usando técnicas convencionales de biología molecular y de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Los fagos que codifican una región variable con la especificidad deseada se seleccionan para la unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Las secuencias de ácido nucleico que codifican el anticuerpo reconstituido se introducen en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para la producción de hibridomas, de tal manera que los anticuerpos que tienen las características de anticuerpos monoclonales son secretados por la célula (véase, por ejemplo, Janeway *et al.*, mencionado anteriormente, Huse *et al.*, mencionado anteriormente, y el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.265.150).

Como alternativa, los anticuerpos se pueden producir mediante ratones transgénicos que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera específicas. Tales métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.545.806 y 5.569.825, y Janeway *et al.*, mencionado anteriormente.

Como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado mediante ingeniería genética, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos humanizados proporcionan de forma ventajosa un menor riesgo de efectos secundarios y pueden permanecer en la circulación por más tiempo. En la técnica se conocen métodos para generar anticuerpos humanizados y se describen en detalle, por ejemplo, en Janeway *et al.*, mencionado anteriormente, documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, Patente Europea N.º 0239400 B1, y patente del Reino Unido N.º 2188638. También se pueden generar anticuerpos

humanizados usando la tecnología de modificación de superficie de anticuerpos descrita, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.639.641 y en Pedersen *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 235, 959-973 (1994).

El resto de direccionamiento se puede unir de forma específica a cualquier marcador de superficie celular adecuado. La elección de un resto de direccionamiento y/o marcador de superficie celular en particular se puede escoger dependiendo de la población de células particular a tener como objetivo. En la técnica se conocen marcadores de superficie celular (véase, por ejemplo, Mufson *et al.*, *Front. Biosci.*, 11: 337-43 (2006); Frankel *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6: 326-334 (2000); y Kreitman *et al.*, *AAPS Journal*, 8 (3): E532-E551 (2006)) y pueden ser, por ejemplo, una proteína o un carbohidrato. En una realización de la invención, el resto de direccionamiento es un ligando que se une de forma específica a un receptor en una superficie celular. Los ejemplos de ligandos incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Fas, ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), una citoquina (por ejemplo, IL-2, IL-15, IL-4, IL-13), una linfoquina, una hormona y un factor de crecimiento (por ejemplo, factor de crecimiento transformante (TGF α), factor de crecimiento neuronal, factor de crecimiento epidérmico).

El marcador de superficie celular puede ser, por ejemplo, un antígeno de cáncer. La expresión "antígeno de cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, proteína, péptido, lípido, carbohidrato, etc.) expresada única o predominantemente o sobreexpresada por una célula tumoral o una célula cancerosa, de manera que el antígeno está asociado con el tumor o el cáncer. El antígeno de cáncer se puede expresar adicionalmente por células normales, no tumorales, o no cancerosas. Sin embargo, en tales casos, la expresión del antígeno de cáncer por las células normales, no tumorales o no cancerosas no es tan fuerte como la expresión por el tumor o las células cancerosas. En este sentido, las células tumorales o cancerosas pueden sobreexpresar el antígeno o expresar el antígeno a un nivel significativamente más alto, en comparación con la expresión del antígeno por células normales, no tumorales o no cancerosas. Además, el antígeno de cáncer se puede expresar adicionalmente por células de un estado diferente de desarrollo o maduración. Por ejemplo, el antígeno de cáncer se puede expresar adicionalmente por células de la fase embrionaria o fetal, que normalmente no se encuentran en un hospedador adulto. Como alternativa, el antígeno de cáncer se puede expresar adicionalmente por células madre o células precursoras, células que no se encuentran normalmente en un hospedador adulto.

El antígeno de cáncer puede ser un antígeno expresado por cualquier célula de cualquier cáncer o tumor, incluyendo los cánceres y tumores que se describen en el presente documento. El antígeno de cáncer puede ser un antígeno de cáncer solamente de un tipo de cáncer o tumor, de manera que el antígeno de cáncer se asocia con o es característico de un solo tipo de cáncer o tumor. Como alternativa, el antígeno de cáncer puede ser un antígeno de cáncer (por ejemplo, puede ser característico) de más de un tipo de cáncer o tumor. Por ejemplo, el antígeno de cáncer se puede expresar por células tanto de cáncer de mama como de cáncer de próstata y no expresarse en absoluto por células normales, no tumorales o no cancerosas.

Los antígenos de cáncer a modo de ejemplo a los que el resto de direccionamiento se puede unir de forma específica incluyen, pero no se limitan a, mucina 1 (MUC1), antígeno asociado al melanoma (MAGE), antígeno de melanoma expresado preferentemente (PRAME), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor de factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSFR), CD56, receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/neu) (también conocido como erbB-2), CD5, CD7, antígeno tumoral de tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa (TRP)1, TRP2, NY-ESO-1, telomerasa y p53. En una realización preferente, el marcador de superficie celular, al que el resto de direccionamiento se une de forma específica, se selecciona entre el grupo que consiste en grupo de diferenciación (CD) 19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina, y Lewis Y. La mesotelina se expresa, por ejemplo, en cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer de pulmón de células no microcíticas, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de trompa de Falopio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, y cáncer pancreático. CD22 se expresa, por ejemplo, en leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia prolinfocítica (PLL), linfoma no Hodgkin, linfoma linfocítico pequeño (SLL), y leucemia linfática aguda (ALL). CD25 se expresa, por ejemplo, en leucemias y linfomas, incluyendo leucemia de células pilosas y linfoma de Hodgkin. El antígeno Lewis Y se expresa, por ejemplo, en cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas. CD33 se expresa, por ejemplo, en leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielomonocítica crónica (CML) y trastornos mieloproliferativos.

En una realización de la invención, el resto de direccionamiento es un anticuerpo que se une de forma específica a un antígeno de cáncer. Los ejemplos de anticuerpos que se unen de forma específica a antígenos de cáncer incluyen, pero no se limitan, anticuerpos contra el receptor de transferrina (por ejemplo, HB21 y variantes del mismo), anticuerpos contra CD22 (por ejemplo, RFB4 y variantes del mismo), anticuerpos contra CD25 (por ejemplo, anti-Tac y variantes del mismo), anticuerpos contra mesotelina (por ejemplo, SS1, MORAb-009, SS, HN1, HN2, MN, MB, y variantes del mismo) y anticuerpos contra antígeno Lewis Y (por ejemplo, B3 y variantes del mismo). En este sentido, el resto de direccionamiento puede ser un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en B3, RFB4, SS, SS1, MN, MB, HN1, HN2, HB21, y MORAb-009, y combinaciones de unión a antígeno de los mismos. Los restos de direccionamiento adicionales a modo de ejemplo adecuados para su uso en las moléculas quiméricas de la

invención se desvelan por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5.242.824 (receptor anti-transferrina); 5.846.535 (anti-CD25); 5.889.157 (anti-Lewis Y); 5.981.726 (anti-Lewis Y); 5.990.296 (anti-Lewis Y); 7.081.518 (anti-mesotelina); 7.355.012 (anti-CD22 y anti-CD25); 7.368.110 (anti-mesotelina); 7.470.775 (anti-CD30); 7.521.054 (anti-CD25); y 7.541.034 (anti-CD22); Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2007/0189962 (anti-CD22); Frankel *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6: 326-334 (2000), y Kreitman *et al.*, *AAPS Journal*, 8 (3): E532-E551 (2006). En otra realización, el resto de direccionamiento puede incluir el resto de direccionamiento de inmunotoxinas conocidas en la técnica. Las inmunotoxinas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, LMB-2 (Anti-Tac(Fv)-PE38), BL22 y HA22 (RFB4(dsFv)-PE38), SS1P (SS1 (dsFv)-PE38), HB21-PE40, y variantes de las mismas. En una realización preferente, el resto de direccionamiento es la porción de unión a antígeno de HA22. HA22 comprende un fragmento de anticuerpo anti-CD22 de Fv unido por puente disulfuro conjugado con PE38. HA22 y variantes del mismo se desvelan en las Publicaciones de Solicitud de Patente Internacional WO 2003/027135 y WO 2009/032954.

En una realización de la invención, la molécula quimérica comprende un conector. El término "conector", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier agente o molécula que conecta la PE de la invención con el resto de direccionamiento. Alguien con una experiencia habitual en la materia reconoce que los sitios en la PE de la invención, que no son necesarios para la función de la PE de la invención, son sitios ideales para unir un conector y/o un resto de direccionamiento, con la condición de que el conector y/o resto de direccionamiento, una vez unidos a la PE de la invención, no interfiera(n) con la función de la PE de la invención, es decir, actividad citotóxica, inhiba el crecimiento de una célula diana, o traqueo prevenga el cáncer. El conector puede ser capaz de formar enlaces covalentes tanto a la PE como al resto de direccionamiento. En la técnica se conocen conectores adecuados e incluyen, pero no se limitan a, conectores de carbono de cadena lineal o ramificada, conectores de carbono heterocíclicos y conectores peptídicos cuando la PE y el resto de direccionamiento son polipéptidos, el conector se puede unir a los aminoácidos a través de grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína). Preferentemente, los conectores se unirán al carbono alfa de los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos terminales.

En el alcance de la invención están incluidas las porciones funcionales de las PE de la invención y moléculas quiméricas que se describen en el presente documento. La expresión "porción funcional", cuando se usa en referencia a una PE o molécula quimérica, se refiere a una parte o fragmento de la PE o molécula quimérica de la invención, parte o fragmento que retiene la actividad biológica de la PE o molécula quimérica de que es una parte (la PE o molécula quimérica precursoras). Las porciones funcionales incluyen, por ejemplo, aquellas partes de una PE o molécula quimérica que conservan la capacidad de unirse de forma específica a, y destruir o inhibir el crecimiento de células diana o tratar o prevenir el cáncer, en una extensión similar, en la misma medida, o en una mayor medida, al igual que la PE o molécula quimérica precursoras. En referencia a la PE o molécula quimérica precursoras, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 68 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 90 % o más, o aproximadamente un 95 % o más, de la PE o moléculas quimérica precursoras.

La parte funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi terminales de la porción, o en ambos extremos, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos de la PE o molécula quimérica precursoras. De forma deseable, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la parte funcional, por ejemplo, uniéndose de forma específica a, y destruyendo o inhibiendo el crecimiento de células diana, teniendo la capacidad de tratar o prevenir el cáncer, etc. de forma más deseable, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica de la PE o molécula quimérica precursoras.

En el alcance de la invención están incluidas las variantes funcionales de las PE de la invención y moléculas quiméricas que se describen en el presente documento. La expresión "variante funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a una PE o molécula quimérica que tiene una identidad de secuencia sustancial o significativa o similitud a una PE o molécula quimérica precursoras, variante funcional que conserva la actividad biológica de la PE o molécula quimérica de la que es una variante. Las variantes funcionales incluyen, por ejemplo, las variantes de la PE o molécula quimérica que se describen en el presente documento (la PE o molécula quimérica precursoras) que conservan la capacidad de unirse de forma específica a, y destruir o inhibir el crecimiento de células diana en una extensión similar, en la misma medida, o en una mayor medida, que la PE o molécula quimérica precursoras. En referencia a la PE o molécula quimérica precursoras, la variante funcional puede ser idéntica, por ejemplo, en aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más, aproximadamente un 96 % o más, aproximadamente un 97 % o más, aproximadamente un 98 % o más, o aproximadamente un 99 % o más en la secuencia de aminoácidos a la PE o molécula quimérica precursoras.

La variante funcional puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la PE o molécula quimérica precursoras con al menos una sustitución conservativa de aminoácidos. Las sustituciones conservativas de aminoácidos se conocen en la técnica e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que un aminoácido que tiene ciertas propiedades químicas y/o físicas se intercambia por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades

químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución conservativa de aminoácidos puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro aminoácido ácido (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituida por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, He, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, etc.), un aminoácido básico sustituido por otro aminoácido básico (Lys, Arg, etc.), un aminoácido con una cadena lateral polar sustituida por otro aminoácido con una cadena lateral polar (Asn, Cys, Gin, Ser, Thr, Tyr, etc.), etc.

Como alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del PE parental o molécula quimérica con al menos una sustitución no conservativa de aminoácidos. En este caso, es preferente que la sustitución de aminoácidos no conservativa no interfiera con, o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. Preferentemente, la sustitución no conservativa de aminoácidos mejora la actividad biológica de la variante funcional, de tal manera que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con la PE o molécula quimérica precursoras.

La PE o molécula quimérica de la invención puede consistir esencialmente de la secuencia o secuencias de aminoácidos especificadas que se describen en el presente documento, de manera que otros componentes de la variante funcional, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambian sustancialmente la actividad biológica de la variante funcional.

La PE o molécula quimérica de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) de la invención pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos de origen natural. En la técnica se conocen aminoácidos sintéticos de este tipo e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano carboxílico, norleucina, ácido α -amino n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxi prolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano carboxílico, ácido α -aminociclohexano carboxílico, ácido α -aminocicloheptano carboxílico, ácido α -(2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido α,γ -diaminobutírico, ácido α,β -diaminopropiónico, homofenilalanina, y α -terc-butilglicina.

La PE o molécula quimérica de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) pueden estar glicosidas, amidadas, carboxiladas, fosforiladas, esterificadas, N-aciladas, cicladas a través de, por ejemplo, un puente disulfuro, o se pueden convertir en una sal de adición de ácido y/ u opcionalmente dimerizadas o polimerizadas, o conjugadas.

Una realización de la invención proporciona un método para producir la PE de la invención que comprende (a) expresar la PE de forma recombinante y (b) purificar la PE. Las PE y moléculas quiméricas de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) se pueden obtener mediante métodos para producir proteínas y polipéptidos conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para síntesis *de novo* de polipéptidos y proteínas se describen en referencias, tales como Chan *et al.*, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2005; *Peptide and Protein Drug Analysis*, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood *et al.*, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; y en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.449.752. Además, las PE y moléculas quiméricas de la invención se pueden expresar de forma recombinante usando los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento usando métodos recombinantes convencionales. Véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994.

El método comprende adicionalmente la purificación de la PE. Una vez expresadas, las PE de la invención se pueden verificar de acuerdo con técnicas de purificación conocidas en la técnica. Las técnicas de purificación a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, y cromatografía en columna, o mediante procedimientos que se describen, por ejemplo, en R. Scopes, *Protein Purification*, Springer-Verlag, NY (1982).

Otra realización de la invención proporciona un método para producir la molécula quimérica de la invención que comprende (a) expresar de forma recombinante la molécula quimérica y (b) purificar la molécula quimérica. La molécula quimérica se puede expresar de forma recombinante y purificar como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. En una realización de la invención, la expresión de forma recombinante de la molécula quimérica comprende insertar una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de direccionamiento y una secuencia de nucleótidos que codifica un PE en un vector. El método puede comprender insertar la secuencia de nucleótidos que codifica el resto de direccionamiento y la secuencia de nucleótidos que codifican la PE en un marco de modo que codifica un polipéptido continuo que incluye una región de resto de direccionamiento funcional la región de PE funcional. En una realización de la invención, el método comprende ligar una secuencia de nucleótidos que codifica la PE a una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de direccionamiento de modo que, después de su expresión, la PE se sitúa en el extremo carboxilo terminal del resto de direccionamiento. En una realización alternativa, el método comprende ligar una secuencia de nucleótidos que

codifica la PE a una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de direccionamiento de modo que, después de su expresión, la PE se sitúa en el extremo amino terminal del resto de direccionamiento.

Además, otra realización de la invención proporciona un método para producir la molécula quimérica de la invención que comprende (a) expresar de forma recombinante la PE de la invención, (b) purificar la PE, y (c) unir de forma covalente un resto de direccionamiento a la PE purificada. La PE de la invención se puede expresar de forma recombinante como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. El método comprende adicionalmente unir de forma covalente un resto de direccionamiento a la PE purificada. El método de unión de una PE a un resto de direccionamiento puede variar de acuerdo con la estructura química del resto de direccionamiento. Por ejemplo, el método puede comprender hacer reaccionar uno cualquiera o más de una diversidad de grupos funcionales, por ejemplo grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂), o sulfhidrilo (-SH) presentes en la PE con un grupo funcional adecuado en el resto de direccionamiento, formando de ese modo un enlace covalente entre la PE y el resto de direccionamiento. Como alternativa o adicionalmente, el método puede comprender la derivatización del resto de direccionamiento o PE para exponer o para unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización también puede incluir la unión de uno o más conectores al resto de direccionamiento o PE.

En otra realización de la invención, las PE y moléculas quiméricas de la invención se pueden producir usando métodos no recombinantes. Por ejemplo, las PE y moléculas quiméricas de la invención que se describen en el presente documento (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) se pueden sintetizar de forma comercial en compañías, tales como Synpep (Dublín, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). En este sentido, las PE y moléculas quiméricas de la invención pueden ser sintéticas, recombinantes, aisladas, y/o purificadas.

En algunas circunstancias puede ser deseable liberar la PE del resto de direccionamiento cuando la molécula quimérica ha alcanzado una o más células diana. En este sentido, las moléculas quiméricas de la invención deben comprender un conector escindible. El conector se puede escindir mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, por vía enzimática. Por ejemplo, cuando la célula diana es una célula cancerosa (por ejemplo, tumor), la molécula quimérica puede incluir un conector escindible en condiciones presentes en el sitio del tumor (por ejemplo, cuando se expone a enzimas asociadas a tumor o pH ácido).

Una realización de la invención proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las PE de la invención o las moléculas quiméricas de la invención que se describen en el presente documento. La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido", y "molécula de ácido nucleico", y generalmente se refiere a un polímero de ADN o ARN, que puede ser de una hebra o de doble hebra, que se puede sintetizar u obtener (por ejemplo, aislar y/o purificar) a partir de fuentes naturales, que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que pueden contener una unión internucleótido natural, no natural, o alterada, tal como un enlace fosforoamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido sin modificar. Por lo general es preferente que el ácido nucleico no comprenda ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, en algunos casos puede ser adecuado, como se discute en el presente documento, que el ácido nucleico comprenda una o más inserciones, delecciones, inversiones, y/o sustituciones.

Preferentemente, los ácidos nucleicos de la invención son recombinantes. Como se usa en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de células vivas mediante la unión de segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de las que se han descrito en (i) anteriormente. Para los fines en el presente documento, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

Los ácidos nucleicos se pueden construir basándose en síntesis química y/o reacciones de ligamiento enzimático usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, y Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico se puede sintetizar por vía química usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de diversas formas diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado después de la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden usar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N⁶-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudoufacilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster de metilo del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención se pueden adquirir en compañías tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria con la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento o una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento.

5 La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas se hibrida en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" se hace referencia a que la secuencia de nucleótidos se hibrida de forma específica a una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento) en una cantidad que se puede detectar más fuertemente que la hibridación no
10 específica. Las condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que podrían distinguir un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que contiene solamente unas pocas faltas de coincidencias dispersas, a partir de una secuencia en la teoría que pasó a tener solamente unas pocas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que se emparejaban con la secuencia de nucleótidos. Las regiones de complementariedad pequeñas de este tipo se fusionan más fácilmente que un complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad hace que sean fácilmente distinguibles. Las condiciones de de rigurosidad relativamente elevada podrían incluir, por ejemplo, condiciones de bajo contenido de sal y/o temperatura elevada, tal como se proporciona con NaCl aproximadamente 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 °C. Las condiciones de rigurosidad elevada de este tipo toleran pocas, por mencionar algunas, faltas de coincidencias entre la secuencia de nucleótidos y el molde o hebra diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de las PE o moléculas quiméricas de la invención. Por lo general se observa que las condiciones se pueden hacer más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

La invención también proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica en aproximadamente un 70 % o más, por ejemplo, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 91 % o más, aproximadamente un 92 % o más, aproximadamente un 93 % o más, aproximadamente un 94 % o más, aproximadamente un 95 % o más, aproximadamente un 96 % o más, aproximadamente un 97 % o más, aproximadamente un 98 % o más, o aproximadamente un 99 %) o más a cualquiera de los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento.

30 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden incorporar en un vector de expresión recombinante. En este sentido, la invención proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. Para los fines en el presente documento, la expresión "vector de expresión recombinante" se refiere a una construcción de oligonucleótido o polinucleótido modificada genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido mediante una célula hospedadora, cuando la construcción comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, proteína, polipéptido o péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para tener el ARNm, proteína, polipéptido o péptido expresado dentro de la célula. Los vectores de la invención no son de origen natural como un conjunto. Sin embargo, partes de los lectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden comprender cualquier tipo de nucleótido, que incluyen, pero no se limitan a ADN y ARN, que pueden ser una sola hebra o de
40 doble hebra, que se pueden sintetizar u obtener en parte a partir de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender uniones internucleótido de origen natural, de origen no natural, o ambos tipos de uniones. Preferentemente, las uniones entre nucleótidos o internucleótido de origen no natural o alteradas no impiden la transcripción o replicación del vector.

45 El vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y se puede usar para transformar o transfectar cualquier célula hospedadora adecuada. Los vectores adecuados incluyen los diseñados para propagación y expansión o para expresión o para ambos, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar entre el grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También se pueden usar vectores bacteriófagos, tales como λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4, y λ NM1149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBIO1, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-C1, pMAM, y pMAMneo (Clontech). Preferentemente, el vector de expresión
55 recombinante es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden preparar usando técnicas convencionales de ADN recombinante que se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, mencionado anteriormente, y Ausubel *et al.*, mencionado anteriormente. Se pueden preparar construcciones de vectores de expresión, que son circulares o
60 lineales, para que contengan un sistema de replicación funcional en una célula hospedadora procariota o eucariota. Los sistemas de replicación se pueden obtener a partir de, por ejemplo, Co1E1, plásmido de 2 μ , λ , SV40, virus de papiloma bovino, y similares.

De forma deseable, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de la transcripción y de la traducción, que son específicos para el tipo de hospedador (por ejemplo, bacteria, hongo, vegetal, o animal) en el que se va a introducir el vector, si fuera apropiado y teniendo en

cuenta si el vector está basado en ADN o en ARN.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de hospedadores transformados o transfectados. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complemento en un hospedador auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higómicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina, y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o no nativo unido de forma operativa a la secuencia de nucleótidos que codifica la PE o molécula quimérica de la invención (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria con o que se hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica la PE o molécula quimérica. La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido, y específicos de desarrollo, está dentro de la experiencia habitual del experto en la materia. De forma análoga, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de la experiencia habitual del experto en la materia. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV, o un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre de murino.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden diseñar para expresión transitoria, para expresión estable, o para ambos. Además, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar para expresión constitutiva o para expresión inducible.

Otra realización de la invención también proporciona una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes que se describen en el presente documento. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener al vector de expresión recombinante de la invención. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota, por ejemplo, vegetal, animal, hongos, o algas, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula hospedadora puede ser una célula cultivada, una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. Para los fines de producción de una PE o molécula quimérica de la invención recombinante, la célula hospedadora es preferentemente una célula procariota, por ejemplo, una célula de *E. coli*.

La invención también proporciona una población de células aislada que comprende al menos una célula hospedadora que se describe en el presente documento. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula hospedadora que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes. Como alternativa, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente (por ejemplo, que consiste esencialmente en) células hospedadoras que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población de células clonales, en la que la población son clones de una sola célula hospedadora que comprende un vector de expresión recombinante, de modo que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la invención, la población de células es una población clonal de células hospedadoras que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en el presente documento.

Las PE de la invención, moléculas quiméricas (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras (incluyendo poblaciones de las mismas), y poblaciones de células se pueden aislar y/o purificar. El término "aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a que se ha retirado de su entorno natural. El término "purificado", como se usa en el presente documento, se refiere a que su pureza ha aumentado, en el que "pureza" es un término relativo, y no se debe interpretar necesariamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 90 % o más, o aproximadamente un 100 %. La pureza es preferentemente de aproximadamente un 90 % o más (por ejemplo, de aproximadamente un 90 % a aproximadamente un 95 %) y más preferentemente de aproximadamente un 98 % o más (por ejemplo, de aproximadamente un 98 % a aproximadamente un 99 %).

Las PE de la invención, moléculas quiméricas (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras (incluyendo poblaciones de las mismas), y poblaciones de células, todas las cuales se denominan de forma colectiva "materiales de la PE de la invención" en lo sucesivo en el presente documento, se pueden formular en una composición, tal como una composición farmacéutica. En este sentido, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las PE, moléculas quiméricas (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales), ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras (incluyendo poblaciones de las mismas), y poblaciones de células, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica de la invención que contiene cualquiera de los materiales de la PE de la invención puede comprender más de un material de PE de la invención,

por ejemplo, un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más PE diferentes. Como alternativa, la composición farmacéutica de comprender un material de PE de la invención en combinación con uno u otros agentes farmacéuticamente activos o fármacos más, tales como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorrubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

Preferentemente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Con respecto a las composiciones farmacéuticas, el vehículo puede ser cualquiera de los usados convencionalmente y está limitado solamente por consideraciones químico-físicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el compuesto o compuestos activos, y mediante la vía de administración. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que se describen en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes, y diluyentes, son bien conocidos por los expertos en la materia y están fácilmente disponibles para el público. Es preferente que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno que sea químicamente inerte para el agente o agentes activos y uno que no tenga efectos secundarios o toxicidad perjudiciales en las condiciones de uso.

La elección del vehículo se determinará en parte por el material de PE de la invención en particular, así como mediante el método en particular usado para administrar el material de PE de la invención. Por consiguiente, existe una diversidad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las siguientes formulaciones para administración parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, interperitoneal, e intratecal), oral, y aerosol administration son a modo de ejemplo y en ningún modo son limitantes. Se puede usar más de una vía para administrar los materiales de PE de la invención, y, en ciertos casos, una vía en particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

Los expertos en la materia conocen bien las formulaciones tópicas. Las formulaciones de este tipo son particularmente adecuadas en el contexto de la invención para su aplicación a la piel.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden incluir (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del material de PE de la invención disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas para chupar y trociscos, cada uno de los cuales contiene una cantidad determinada previamente del principio activo, en forma de sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, y los alcoholes de polietileno, ya sea con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsula pueden ser del tipo de gelatina de cubierta dura o blanda que contienen, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato cálcico y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, celulosa microcristalina, goma arábica, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato cálcico, estearato de cinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tampón, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, aromatizantes y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastilla para chupar pueden comprender el material de PE de la invención en un sabor, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto, así como pastillas que comprenden el material de PE de la invención en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, sacarosa y goma arábica, emulsiones, geles y similares, que contienen adicionalmente tales excipientes tal como se conocen en la técnica.

El material de PE de la invención, solo o en combinación con otros componentes adecuados, se puede preparar en formulaciones de aerosol para su administración mediante inhalación. Estas formulaciones de aerosol se pueden colocar en agentes propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. Las poblaciones de aerosol también se pueden formular como agentes farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tal como en un nebulizador o un atomizador. Las formulaciones de pulverización de este tipo también se pueden usar para pulverizar en la mucosa.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles, isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. La PE de la invención se puede administrar en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, tal como un líquido estéril o mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, un alcohol, tal como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos o glicéridos, o glicéridos de ácidos grasos acetilados, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites, que se pueden usar en formulaciones parenterales, incluyen petróleo, aceites animales, vegetales, o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva,

vaselina y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico, y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

- 5 Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales de metal alcalino graso, amonio, y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio, y haluros de alquil piridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo, y olefina, alquilo, olefina, éter, y sulfatos de monoglicéridos, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de amina graso, alcanolamidas de ácido graso, y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-β-aminopropionatos, y sales de 2-alquil-imidazolina y amonio cuaternario, y (e) mezclas de los mismos.

15 Las formulaciones parenterales por lo general contendrán aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 25 % en peso del material de PE de la invención en solución. Se pueden usar conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones variara por lo general de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polietilenglicol, tales como monooleato de sorbitán y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formada por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en envases sellados de dosis unitaria o múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y se pueden almacenar en un estado secado por congelación (liofilizado) que requiere solamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente descrito. Los requisitos para vehículos farmacéuticos eficaces para composiciones parenterales son bien conocidos por los expertos en la materia (véanse, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)).

30 Alguien con experiencia en la materia observará que, además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, los materiales de PE de la invención se pueden formular como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas.

35 Para los fines de la invención, la cantidad o dosis del material de PE de la invención administrada debería ser suficiente para efectuar una respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el mamífero en un período de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de PE de la invención debería ser suficiente para inhibir el crecimiento de una célula diana o tratar o prevenir el cáncer en un periodo de aproximadamente 2 horas o un periodo superior, por ejemplo, de 12 a 24 o más horas, desde el momento de la administración. En ciertas realizaciones, el periodo de tiempo podría ser aún más largo. La dosis se determinará por la eficacia del material de PE de la invención en particular y la afección del mamífero (por ejemplo, ser humano), así como el peso corporal del mamífero (por ejemplo, ser humano) a tratar.

45 En la técnica se conocen muchos ensayos para determinar una dosis administrada. Una dosis administrada se puede determinar *in vitro* (por ejemplo, cultivos celulares) o *in vivo* (por ejemplo, estudios en animales). Por ejemplo, la dosis administrada se puede determinar mediante la determinación de la CI_{50} (la dosis que consigue una inhibición semi máxima de los síntomas), la DL_{50} (la dosis letal para un 50 % de la población), la DE_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en un 50 % de la población), y el índice terapéutico en cultivo celular y/o estudios en animales. El índice terapéutico es la proporción de DL_{50} con respecto a la DE_{50} (es decir, DL_{50}/DE_{50}).

50 La dosis del material de PE de la invención también se determinará por la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que pudiera acompañar a la administración de un material de PE de la invención en particular. Por lo general, el médico tratante decidirá la dosificación del material de PE de la invención con el que se trata a cada paciente individual, teniendo en cuenta una diversidad de factores, tales como edad, peso corporal, salud general, dieta, sexo, material de PE de la invención administrada, vía de administración, y la gravedad de la afección que se está tratando. A modo de ejemplo y no pretendiendo limitar la invención, la dosis del material de PE de la invención puede ser de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto que se está tratando/día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 1 a aproximadamente a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 10 a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal/día, de aproximadamente 25 a aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal/día, o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día.

65 Como alternativa, los materiales de PE de la invención se pueden modificar en una forma de depósito, de modo que en la forma en la que se libera el material de PE de la invención en el cuerpo al que se administra esta controlada con respeto al tiempo y la ubicación dentro del cuerpo (véase, por ejemplo, el documento de Patente de Estados

Unidos N.º 4.450.150). Las formas de depósito de materiales de PE de la invención pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los materiales de PE de la invención y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en el que los materiales de PE de la invención se encapsulan o se difunden a través del material y/o degradación del material no poroso. A continuación con el depósito se implanta en la posición deseada dentro del cuerpo y los materiales de PE de la invención se liberan del implante a una velocidad determinada previamente.

Los materiales de PE de la invención se pueden someter a ensayo para citotoxicidad mediante ensayos conocidos en la técnica. Los ejemplos de ensayos de citotoxicidad incluyen un ensayo de WST, que mide la proliferación celular usando la sal de tetrazolio WST-1 (reactivos y kits disponibles en Roche Applied Sciences), tal como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO 2011/032022.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas, las PE, moléculas quiméricas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, o poblaciones de células se pueden usar en métodos para tratar o prevenir el cáncer. Sin quedar ligado por ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree que las PE de la invención destruyen o inhiben el crecimiento de las células a través de la inhibición de la síntesis de proteínas en células eucariotas, por ejemplo, mediante la inactivación de la ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2). Sin quedar ligado a una teoría o mecanismo en particular, las moléculas quiméricas de la invención reconocen y se unen de forma específica a los marcadores de superficie celular, liberando de ese modo la PE citotóxica a la población de células que expresa el marcador de superficie celular con una reactividad cruzada mínima o sin ella con células que no expresan el marcador de superficie celular. De esta manera, la citotoxicidad de la PE puede ser dirigida a destruir o inhibir el crecimiento de una población de células en particular, por ejemplo, células cancerosas. En este sentido, la invención proporciona un método para tratar o prevenir el cáncer en un mamífero que comprende administrar al mamífero cualquiera de las PE, moléculas quiméricas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, célula hospedadora, población de células, o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Los términos "tratar" y "prevenir" así como expresiones que surgen a partir de los mismos, como se usa en el presente documento, no necesariamente implican un 100 % o tratamiento o prevención completos. Por el contrario, existen diversos grados de tratamiento o prevención de los cuales alguien con experiencia habitual en la materia reconoce que tienen un beneficio potencial o efecto terapéutico. En este sentido, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o prevención proporcionado por el método de la invención puede incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo cáncer, que se está tratando o previniendo. Además, para los fines en el presente documento, "prevención" que incluyen retraso del inicio de la enfermedad, o un síntoma o afección del mismo.

Para los fines de los métodos de la invención, en los que se administran las células hospedadoras o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogénicas o autólogas para el hospedador. Preferentemente, las células son autólogas para el hospedador.

Con respecto a los métodos de la invención, el cáncer puede ser cualquier cáncer, incluyendo cualquiera de de la glándula adrenal, sarcomas (por ejemplo, sarcoma sinovial, sarcoma osteogénico, leiomiomasarcoma uterino, angiosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, mixoma, rabdomioma, fibroma, lipoma, y teratoma), linfomas (por ejemplo, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin), carcinoma hepatocelular, glioma, cánceres de cabeza (por ejemplo, carcinoma de células escamosas), cánceres de cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas), cáncer linfocítico agudo, leucemias (por ejemplo, leucemia de células pilosas, leucemia mieloide (aguda y crónica), leucemia linfática (aguda y crónica), leucemia prolinfocítica (PLL), leucemia mielomonocítica (aguda y crónica), y leucemia linfocítica (aguda y crónica), cáncer de hueso ((sarcoma osteogénico, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, tumor de células gigantes malignas, cordoma, osteocondroma (exostosis osteocartilaginosa), condroma benigno, condroblastoma, fibroma condromixoide, osteoma osteoide, y tumores de células gigantes), cáncer cerebral (astrocitoma, meduloblastoma, glioma, ependimoma, germinoma (pinealoma), glioblastoma multiforme, oligodendroglioma, schwannoma y retinoblastoma), cáncer de trompa de Falopio, cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal, o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de la nariz, cavidad nasal, u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma y fibrosarcoma), trastornos mieloproliferativos (por ejemplo, cáncer crónico mieloide), cánceres de colon (por ejemplo, carcinoma de colon), cáncer esofágico (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma y linfoma), cáncer de cuello uterino (carcinoma de cuello uterino y displasia de cuello uterino preinvasiva), cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, cáncer de hipofaringe, cáncer de laringe, cánceres de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hepatoblastoma, angiosarcoma, adenoma hepatocelular, y hemangioma), cánceres de pulmón (por ejemplo, carcinoma broncogénico (células escamosas, células pequeñas no diferenciadas, células grandes no diferenciadas, y adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, hamartoma condromatoso, cáncer de pulmón de células microcíticas, cáncer de pulmón de células no microcíticas y adenocarcinoma de pulmón), mesotelioma maligno, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células

escamosas, sarcoma de Kaposi, nevus, nevus displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma, y queloides), mieloma múltiple, cáncer nasofaríngeo, cáncer de ovario (por ejemplo, carcinoma de ovario (cistoadenocarcinoma seroso, cistoadenocarcinoma mucinoso, carcinoma endometriode y adenocarcinoma de células transparentes), tumores de células de la granulosa-teca, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma, y teratoma maligno), cáncer pancreático (por ejemplo, adenocarcinoma ductal, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoides, y VIPoma), cáncer peritoneal, omento, mesentérico, cáncer de faringe, cáncer de próstata (por ejemplo, adenocarcinoma y sarcoma), cáncer rectal, cáncer de riñón (por ejemplo, adenocarcinoma, tumor de Wilms (nefroblastoma), y carcinoma de células renales), cáncer de intestino delgado (adenocarcinoma, linfoma, tumores carcinoides, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma, y fibroma), cáncer de tejido blando, cáncer de estómago (por ejemplo, carcinoma, linfoma, y leiomiosarcoma), cáncer testicular (por ejemplo, seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, tumor de células de Leydig, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides, y lipoma), cáncer del útero (por ejemplo, carcinoma endometrial), cáncer de tiroides, y cánceres uroteliales (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transicionales, adenocarcinoma, cáncer de uréter, y cáncer de la vejiga urinaria).

Como se usa el presente documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier mamífero, que incluye, pero no se limita a, mamíferos del orden Roedores, tales como ratones y hámsters, y mamíferos del orden Logomorfos, tales como conejos. Es preferente los mamíferos sean del orden Carnívoros, incluyendo Felinos (gatos) y Caninos (perros). Es más preferente que los mamíferos sean del orden Artiodáctilos, que incluyen Bovinos (vacas) y Porcinos (cerdos) o del orden Perisodáctilos, incluyendo Equinos (caballos). Lo más precedentes que los mamíferos sean del orden Primates, Cébidos, o Simios (monos) o del orden Antropoides (seres humanos y simios). Un mamífero especialmente preferente es el ser humano.

También se proporciona un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula diana que comprende poner en contacto la célula con la PE de cualquiera de las PE, moléculas quiméricas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, célula hospedadora, población de células, o composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de la célula diana. El crecimiento de la célula diana se puede inhibir con cualquier cantidad, por ejemplo, con aproximadamente un 10 % o más, aproximadamente un 15 % o más, aproximadamente un 20 % o más, aproximadamente un 25 % o más, aproximadamente un 30 % o más, aproximadamente un 35 % o más, aproximadamente un 40 % o más, aproximadamente un 45 % o más, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 55 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 65 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más, aproximadamente un 95 % o más, o aproximadamente un 100 %. La célula diana se puede proporcionar en una muestra biológica. Una muestra biológica se puede obtener a partir de un mamífero en cualquier manera adecuada y a partir de cualquier fuente adecuada. La muestra biológica se puede obtener, por ejemplo, mediante la extracción de sangre, leucaféresis, y/o biopsia o necropsia tumoral. La etapa de puesta en contacto se puede producir *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferentemente, la puesta en contacto es *in vitro*.

En una realización de la invención, la célula diana es una célula cancerosa. La célula diana puede ser una célula cancerosa de cualquiera de los cánceres que se describen en el presente documento. En una realización de la invención, la diana puede expresar un marcador de superficie celular. El marcador de superficie celular puede ser cualquier marcador de superficie celular descrito en el presente documento con respecto a otros aspectos de la invención. El marcador de superficie celular se puede seleccionar, por ejemplo, entre el grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina, y Lewis Y.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención adicionalmente pero, por supuesto, no se deberían interpretar en modo alguno como limitantes de su alcance.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la frecuencia real en los de la clase 2 de HLA en una población base de donantes sin tratamiento previo en comparación con la de la población mundial.

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 65 donantes sanos obtenidas a partir del banco de sangre del NIH y 50 pacientes sometidos a tratamiento con inmunotoxina en el NCI. Las PBMC se aislaron a partir de capas leucocíticas mediante centrifugación de densidad con Ficoll. Los haplotipos de clase I y de clase II de HLA de las PBMC de pacientes y donantes sanos se identificaron usando un tic de formación de tipos de tejidos basado en PCR-SSP/SSO. Las PBMC se congelaron a continuación en suero AB humano inactivado por calor y medios de congelación convencionales y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Una población base de 65 donantes sanos se estudió para proporcionar información sobre el número y frecuencia de alotipos DR de HLA expresados en la población mundial. El análisis de los alotipos expresados en la población base de donantes sin reglamento previo se comparó con la población mundial (Middleton, D. *et al.*, New Allele Frequency Database: www.allelefrequencys.net, *Tissue Antigens*, 61 (5): 403-7(2003)), que mostraba que había una

representación razonable de los alelos DRB1 de la clase II de HLA principal en la población base de donantes sin tratamiento previo. El análisis estadístico mostraba una correlación entre la población mundial y la población base de donantes de $R^2 = 0,52$. La Figura 1 compara la frecuencia de los diferentes tipos de alelos de clase 2 de HLA en la población mundial con la población base de donantes sin tratamiento previo. La Tabla 1 muestra los haplotipos DRB1 de la clase II de HLA de la población de donantes.

5

TABLA 1

Donante N.º	ID del Donante	Alelos de HLA II DRB1		Donante N.º	ID del Donante	Alelos de HLA II DRB1	
1	10710aph	1001	1501	26	102609aph	0404	0802
2	021610aph	15	1501	27	100509aph	07	07
3	030210aph	12	1602	28	082509aph	0803	1502
4	030910aph	0301	401	29	120809aph	1101	1302
5	031810aph	0301	1501	30	030211aph	03	11
6	033010aph	08	15	31	090109aph	0301	1303
7	040110aph	0804	13	32	092809aph	0405	1303
8	040610aph	3021	1503	33	032510aph	07	1501
9	040810aph	0407	15	34	121709aph	1101	1502
10	041310aph	0101	301	35	012110aph	0401	07
11	080409aph	0701	1302	36	082709aph	0401	1302
12	081209aph	1404	1501	37	021611aph	04	13
13	111909aph	1001	15	38	100109aph	0401	1502
14	101909aph	0401	0404	39	031611aph	804	1303
15	020210aph	03	0401	40	011910aph	1001	15
16	020410aph	0402	1101	41	032311aph	1501	1502
17	122209aph	12	1602	42	041311aph	0301	0701
18	122910aph	0301	1101	43	072309aph	0803	1502
19	010510aph	1301	1503	44	071311aph	01	07
20	011410aph	0301	03	45	073009aph	0804	1503
21	111209aph	0804	1101	46	042011aph	0806	1501
22	110909aph	1001	1602	47	060811aph	01	13
23	030410aph	0401	1501	48	061511aph	0802	1503
24	011210aph	0401	1304	49	051111aph	0405	11
25	101509aph	0101	0301	50	062911aph	0404	15

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la preparación de una biblioteca de péptidos para su uso para estimular linfocitos T.

- 5 Para determinar la inmunogenicidad del resto de toxina, se diseñó una biblioteca de 111 péptidos, que abarca toda la secuencia de PE38. Cada uno de los péptidos tenía un tamaño de 15 aminoácidos y se solapaban con 12 aminoácidos con la excepción de las SEQ ID NOs: 31 y 32 de péptidos, que se solapaban con 11 aminoácidos. Los péptidos se sintetizaron a una pureza > 95 % tal como se determina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (American Peptide Co. Inc., Sunnyvale, CA). Los péptidos sintéticos liofilizados se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) para preparar soluciones de reserva de 10 μ M.
- 10 Los péptidos se agruparon en 22 combinaciones como se muestra en la Tabla 2. La Tabla 2 muestra las secuencias, SEQ ID NOs, y los números de la combinación de los péptidos usados para la formación de mapas de epítomos.

TABLA 2

SEQ ID NO:	Secuencia	combinación	SEQ ID NO:	Secuencia	combinación	SEQ ID NO:	Secuencia	combinación
31	PEGGSLAALTAHQAC	1	68	ANGPADSGDALLERN	8	105	RGRIRNGALLRVYVP	15
32	SLAALTAHQACHLPL	1	69	PADSGDALLERNYPT	8	106	IRNGALLRVYVPRSS	16
33	ALTAHQACHLPLETF	1	70	SGDALLERNYPTGAE	8	107	GALLRVYVPRSSSLPG	16
34	AHQACHLPLETFRH	1	71	ALLERNYPTGAEFLG	9	108	LRVYVPRSSSLPGFYR	16
35	ACHLPLETFRHRQP	1	72	ERNYPTGAEFLGDGG	9	109	YVPRSSSLPGFYRTSL	16
36	LPLETFRHRQPRGW	2	73	YPTGAEFLGDGGDVS	9	110	RSSSLPGFYRTSLTLA	16
37	ETFRHRQPRGWEQL	2	74	GAEFLGDGGDVSFST	9	111	LPGFYRTSLTLAAPE	17
38	TRHRQPRGWEQEQC	2	75	FLGDGGDVSFSTRGT	9	112	FYRTSLTLAAPEAAG	17
39	RQPRGWEQEQCGYP	2	76	DGGDVSFSTRGTQNW	10	113	TSLTLAAPEAAGEVE	17
40	RGWEQEQCGYPVQR	2	77	DVSFSTRGTQNWTV	10	114	TLAAPEAAGEVERLI	17
41	EQEQCGYPVQRLVA	3	78	FSTRGTQNWTVRLL	10	115	APEAAGEVERLIGHP	17
42	EQCGYPVQRLVALYL	3	79	RGTQNWTVRLLQAH	10	116	AAGEVERLIGHPLPL	18
43	GYPVQRLVALYLAAR	3	80	QNWTVRLLQAHRQL	10	117	EVERLIGHPLPLRLD	18
44	VQRLVALYLAARLSW	3	81	TVERLLQAHRQLEER	11	118	RLIGHPLPLRLDAIT	18
45	LVALYLAARLSWNQV	3	82	RLLQAHRQLEERGYV	11	119	GHPLPLRLDAITGPE	18
46	LYLAARLSWNQVDQV	4	83	QAHRQLEERGYVFG	11	120	LPLRLDAITGPEEEG	18
47	AARLSWNQVDQVIRN	4	84	RQLEERGYVFGYHCG	11	121	RLDAITGPEEEGGRL	19
48	LSWNQVDQVIRNALA	4	85	EERGYVFGYHGTFL	11	122	AITGPEEEGGRRLETI	19

SEQ ID NO:	Secuencia	combinación	SEQ ID NO:	Secuencia	combinación	SEQ ID NO:	Secuencia	combinación	SEQ ID NO:	Secuencia	combinación
49	NGVDQVIRNALASPG	4	86	GYVFGYHGTFLEAA	12	123	GPEEEGGRLETILGW	19			
50	DQVIRNALASPGSGG	4	87	FVGYHGTFLEAAQSI	12	124	EEGGRLETILGWPLA	19			
51	IRNALASPGSGGDLG	5	88	YHGTFLEAAQSIVFG	12	125	GRLETILGWPLAERT	19			
52	ALASPGSGGDLGEAI	5	89	TFLEAAQSIVFGGVR	12	126	ETILGWPLAERTWI	20			
53	SPGSGGDLGEAIREQ	5	90	EAQSIVFGGVRARS	12	127	LGWPLAERTWIPSA	20			
54	SGGDLGEAIREQPEQ	5	91	QSIVFGGVRARSQDL	13	128	PLAERTWIPSAIPT	20			
55	DLGEAIREQPEQARL	5	92	VFGGVRARSQDLDAI	13	129	ERTWIPSAIPTDPR	20			
56	EAIREQPEQARLALT	6	93	GVRARSQDLDAIWVG	13	130	WIPSAIPTDPRNVG	20			
57	REQPEQARLALTAA	6	94	ARSQDLDAIWVGFYI	13	131	PSAIPDPRNVGGDL	21			
58	PEQARLALTAAAES	6	95	QDLDAIWVGFYIAGD	13	132	IPTDPRNVGGDLDP	21			
59	ARLALTAAAESERF	6	96	DAIWVGFYIAGDPAL	14	133	DPRNVGGDLDPSSIP	21			
60	ALTLAAAESERFVRQ	6	97	WRGFYIAGDPALAYG	14	134	NVGGDLDPSSIPDKE	21			
61	LAAAESERFVRQGTG	7	98	FYIAGDPALAYGYAG	14	135	GDLPSSIPDKEGAI	21			
62	AESERFVRQGTGNDE	7	99	AGDPALAYGYAGDQE	14	136	DPSSIPDKEGAI	22			
63	ERFVRQGTGNDEAGA	7	100	PALAYGYAGDQEPDA	14	137	SIPDKEGAI	22			
64	VRQGTGNDEAGAANG	7	101	AYGYAGDQEPDARGR	15	138	DKEGAI	22			
65	GTGNDEAGAANGPAD	7	102	YAGDQEPDARGRIRN	15	139	QAI	22			
66	NDEAGAANGPADSGD	8	103	DQEPDARGRIRNGAL	15	140	SALPDYASQPGKPPR	22			
67	AGAANGPADSGDALL	8	104	PDARGRIRNGALLRV	15	141	PDYASQPGKPPREDL	22			

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que la expansión *in vitro* linfocitos T de donante sin tratamiento previo mejora la sensibilidad y el nivel de respuesta de los linfocitos T a las combinaciones de péptidos.

5 Para imitar la respuesta inmunológica que se produce en pacientes que siguen un tratamiento y para superar la baja sensibilidad y la falta de respuesta en muestra de donante sin tratamiento previo en el ensayo a corto plazo, una etapa de expansión *in vitro* de 17 días se usó para expandir la población específica de linfocitos T (Oseroff *et al.*, *J. Immunol.*, 185 (2): 943-55 (2010)). Las células se incubaron durante 14-17 días después de la estimulación con inmunotoxina. Para la estimulación, se usó la inmunotoxina LeY y se dirige a LMB9 o B3 (dsFv)-PE38 (Brinkmann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (16): 7538-42 (1993)), un antígeno no presente en células inmunitarias humanas. El día 14-17, las células se cosecharon y se sometieron al ensayo con un ensayo ELISpot de interleuquina (IL)-2 usando las 22 combinaciones de péptidos de la Tabla 2. La petición de la etapa de expansión *in vitro* mejoró la sensibilidad y el nivel de respuesta del ensayo ELISpot (por ejemplo, se observaron más células formadoras de manchas (SFC)). La etapa de expansión *in vitro* permitió la detección de una respuesta específica de CD4 a partir de donantes voluntarios y también redujo el número de células usadas para cada ensayo.

Los datos representativos se muestran en las Figuras 2A y 2B. La Figura 2A muestra el recuento de los pocillos de ELISpot de IL-2 lo que indica una respuesta de los linfocitos T 031810aph de donante sin tratamiento previo para una estimulación inicial de LMB9 (1,6 µg/ml) seguido de reestimulación con medio solo (sin péptido) (M) o las combinaciones de péptidos 3, 16, o 22 después de 17 días de expansión *in vitro*. La Figura 2B muestra el recuento de los pocillos de ELISpot de IL-2 lo que indica una respuesta de los linfocitos T 031810aph de donante sin tratamiento previo para una estimulación inicial de LMB9 (1,6 µg/ml) seguido de reestimulación con medio solo (sin péptido) (M) o las combinaciones de péptidos 3, 16, o 22 sin expansión *in vitro*.

25 Sin desear quedar ligado a una teoría o mecanismo en particular, se cree que este enfoque imitaba la respuesta inmunitaria porque, al igual que *in vivo*, toda la inmunotoxina recombinante (RIT) se internalizó con la célula presentadora de antígeno (APC), se procesó, y se presentó durante los primeros pocos días de cultivo. Los linfocitos T específicos que respondían a los péptidos presentados de forma natural se mantuvieron y se expandieron usando IL-2. Los epítotos que reconocían esos linfocitos T después de los 17 días de expansión se procesaron de forma natural y presentaban péptidos de forma natural.

Ejemplo 4

35 Este ejemplo demuestra que LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3) estimula una respuesta de los linfocitos T para la mayoría de los donantes.

Después de la estimulación inicial con inmunotoxina y 14 días de expansión, la mitad de las células se cosecharon y se expusieron a las combinaciones de péptidos para una identificación sistemática inicial de la combinación con ELISpot de IL-2. El día 17, las células restantes se usaron para repetir la identificación sistemática de la combinación y se realizó una identificación sistemática fina para los pocillos positivos observados. Se observaron patrones de respuesta diferentes para los 28 donantes el día 14 del ensayo. Algunas identificaciones sistemáticas del donante revelaban una respuesta a una sola combinación (por ejemplo, los donantes 1, 4, 7, y 8) mientras que otros donantes (por ejemplo, los donantes 15, 16, y 23) revelaban respuestas a 3-4 combinaciones. Dado que los péptidos se solapaban, había un solapamiento entre combinaciones tal como, por ejemplo, los casos en los que las combinaciones secuenciales presentaban respuestas (por ejemplo, la respuesta a las combinaciones 15 y 16 para los donantes 15 y 18). Se determinó que un umbral era de 85 SFC/(1 x 10⁶). Este umbral se determinó porque para los valores inferiores a 85 SFC/(1 x 10⁶), ninguna de las respuestas desde el día 14 era reproducible el día 17 o cuando la expansión *in vitro* se repetía. Las respuestas superiores a 85 SFC/(1 x 10⁶) eran reproducibles.

50 Cuatro donantes (donantes 25-28) no presentaban respuesta (por encima del umbral determinado) a ninguna combinación y se consideró que no respondían. De los 28 donantes iniciales que se identificaron de forma sistemática completamente, 24 donantes presentaban una respuesta al menos una combinación. Diferentes donantes presentaban diferentes niveles de respuesta máxima. Algunos donantes (por ejemplo, los donantes 2, 7, y 10) presentarán una respuesta máxima elevada (superior a 1100 SFC para la combinación 3), mientras que otros donantes (por ejemplo, los donantes 3 y 9) presentarán una respuesta de 250-320 SFC para la misma combinación.

60 El número de donantes identificados sistemáticamente aumentó hasta 50. El número de células formadoras de manchas observadas entre los 50 donantes se completó para cada una de las 22 combinaciones de péptidos. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 3. Un análisis de los 50 donantes muestra que la combinación 3 (en el dominio II de PE) proporcionaba la mayoría de las respuestas (Tabla 3; Figura 3). Los resultados sugieren que la combinación 3 era una combinación inmunodominante, que presentaba respuestas estimuladas a partir de muchos donantes con HLA diferentes.

65

TABLA 3

Péptido	Manchas totales (n = 50) en Células Formadoras de Manchas/1 millón de células	Péptido	Manchas totales (n = 50) en Células Formadoras de Manchas/1 millón de células
sin péptido	1434,5	combinación 12	4235
combinación 1	4947,5	combinación 13	1660
combinación 2	5952,5	combinación 14	6880
combinación 3	22555	combinación 15	4750
combinación 4	1667,5	combinación 16	8555
combinación 5	1925	combinación 17	1792,5
combinación 6	2742,5	combinación 18	1965
combinación 7	5415	combinación, 19	4597,5
combinación 8	3472,5	combinación 20	1680
combinación 9	2245	combinación 21	1435
combinación 10	3572,5	combinación 22	1360
combinación 11	7147,5	-	-

Una identificación sistemática fina de la combinación 3 para encontrar la región o regiones inmunodominantes mostraba que, para la mayoría de los donantes, los péptidos de las SEQ ID NOs: 44 y 45 eran responsables de la respuesta dentro de la combinación 3 (Figura 4). La Figura 4 muestra que los péptidos de las SEQ ID NOs: 44 y 45 contenían una región común (LVALYLAARLSW) (SEQ ID NO: 3) para estimular los linfocitos T en la mayoría de los pacientes a pesar de tener un estado de HLA diferente.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra que las sustituciones L294A, L297A, Y298A, L299A, o R302A en LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3) reducen la inmunogenicidad de LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3).

Los péptidos de las SEQ ID NOs: 44 y 45 (dentro de la combinación 3) tienen 12 aminoácidos en común. Este área común, LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3), corresponde a las posiciones 294-305 del resto de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y contiene tanto el sitio de unión a MHC como el sitio de unión al receptor de linfocitos T. Cada aminoácido en LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3) estaba sustituido con alanina. Las muestras de 9 donantes sin tratamiento previo y de 2 pacientes se estimularon con LMB9 durante 17 días y se sometieron al ensayo usando ELISpot de IL-2 como se ha descrito en el Ejemplo 3. La Tabla 4 resume los datos de la identificación sistemática de 11 muestras frente a los péptidos sustituidos. Para 10 de las 11 muestras, una sustitución o más disminuía la respuesta por debajo de un 7 % de la respuesta para el tipo silvestre (WT). Para todos los donantes excepto para uno, la sustitución de L297A reducía la respuesta a un 7 % o inferior. Y298A reducía la respuesta en 9 de las 11 muestras, y R302A reducía la respuesta en 7 de las 11 muestras. La Tabla 4 muestra el porcentaje de respuesta obtenida con el péptido WT.

TABLA 4

	Pacien- te 091510	Pacien- te 012810	d01071 0	d02161 0	d031810	d033010	d040610	d010510	d111909	d030410	d122209
Medio	0 %	2 %	0 %	1 %	10 %	3 %	1 %	14 %	0 %	0 %	13 %
WT 15	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
L294A	5 %	21 %	26 %	6 %	26 %	1 %	7 %	23 %	21 %	3 %	49 %
L297A	0 %	2 %	6 %	2 %	6 %	1 %	6 %	6 %	7 %	5 %	52 %
Y298A	0 %	0 %	3 %	2 %	17 %	2 %	1 %	3 %	0 %	3 %	19 %
L299A	5 %	112 %	1 %	28 %	6 %	78 %	45 %	19 %	14 %	24 %	44 %
R302A	14 %	63 %	3 %	6 %	22 %	3 %	7 %	14 %	7 %	5 %	11 %
L303A	71 %	356 %	78 %	27 %	46 %	50 %	59 %	28 %	117 %	70 %	85 %
S304A	133 %	305 %	82 %	26 %	106 %	69 %	56 %	43 %	117 %	64 %	109 %
W305A	186 %	628 %	76 %	58 %	104 %	101 %	64 %	45 %	117 %	132 %	87 %

Sin quedar ligado a ninguna teoría o mecanismo en particular, se cree que la disminución de la respuesta después de un cambio en un solo aminoácido se puede atribuir a una interrupción de la unión del péptido a la hendidura(s) de la molécula de HLA o a una incapacidad del receptor de linfocitos T para reconocer el péptido cambiado. En cualquier caso, los péptidos sustituidos L297A e Y298A causaban una distribución de la respuesta y, por lo tanto, se puede considerar que proporcionan una reducción de la inmunogenicidad.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra que la sustitución de R302A no crea ningún epítipo de linfocitos T nuevo y proporciona una reducción de la respuesta de los linfocitos T.

Para preparar RIT R302 HA22 y L297A HA22 como se ha descrito anteriormente se usó mutagénesis dirigida al sitio (Pastan *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 248: 503-18 (2004)). La actividad citotóxica en las células CA46 se comparó con la de HA22 de tipo silvestre (Figura 5). La Figura 5 muestra que las construcciones de HA22 con la sustitución de L297A o R302A eran citotóxicas. La CI_{50} de FIA22, L297A HA22, y R302A HA22 era 1,1, 1,8, y 1,8 ng/ml, respectivamente.

Las PBMC de los donantes 010710 y 111909 se cultivaron durante 14 días con cualquiera de WT HA22 o con HA22-R302A y se sometieron a ensayo para la respuesta de los linfocitos T después de reestimulación sin péptido, péptido de tipo silvestre LVALYLAARLSWNQV (SEQ ID NO: 45) (WT15), o LVALYLAAALSWNQV (SEQ ID NO: 145) (R302A). Para ambos donantes, 010710 (Figura 6A) y 111909 (Figura 6B), no se observaron nuevos epítopos, y la respuesta de los linfocitos T al péptido sustituidos disminuyó.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra que la delección de la porción del dominio II que contiene el epítipo inmunodominante reduce la respuesta de los linfocitos T a los péptidos de PE38.

Como se muestra en el Ejemplo 4, el dominio II contiene un epítipo inmunodominante y promiscuo (contenido en las SEQ ID NOs: 44 y 45 de la combinación 3). PE-LR (resistencia a la degradación lisosómica) (también conocido como LR o LR RIT) contiene una delección del dominio II excepto para la secuencia de escisión de furina RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 8), que está presente en las SEQ ID NOs: 37 y 38. Por lo tanto, LR RIT contiene los restos de los aminoácidos 274-284 y 395-613 de SEQ ID NO: 1.

La respuesta de los linfocitos T de donante que se estimularon con HA22 (que contiene PE38) para las 22 combinaciones de péptidos de la Tabla 2 se compararon con las de los linfocitos T de donante que se estimularon con PE-LR (que carece completamente del epítipo inmunodominante).

El Día 0, los linfocitos T de tres donantes (Donante 031510, Donante 021610, o Donante 101509) se sembraron en placas de 6 pocillos y se estimularon con 10 µg/ml de cualquiera de HA22 o PE-LR. El día 14, la células se cosecharon y se sembraron en una placa de ELISpot de IL-2 y se incubaron con los péptidos de una de cada una de las 22 combinaciones de la Tabla 2 en replicados de 4. Los controles incluían células cultivadas con ceftazidima (CEFT), células sin estimulación con antígeno el día 0 y ninguna estimulación con antígeno el día 14 ("línea M"), y células con estimulación con LMB9 el día 0 y ninguna estimulación con antígeno el día 14 ("sin péptido").

Los resultados se muestran en las Figuras 7A (Donante 031510), 7B (Donante 021610), y 7C (Donante 101509). Los linfocitos T de los tres donantes demostraban una respuesta después de estimulación con HA22 (que contiene PE38) y reestimulación con los péptidos de la combinación 3. No se observó respuesta para las células que se estimularon con PE-LR.

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra la identificación de epítomos de linfocitos T en el dominio III de PE.

Después de estimulación inicial con inmunotoxina y 14 días de expansión, los linfocitos T de 20 donantes se cosecharon y se expusieron a las combinaciones de péptidos para una identificación sistemática inicial de la combinación con ELISpot de IL-2 como se ha descrito en el Ejemplo 4. El día 17, las células restantes se usaron para repetir la identificación sistemática de la combinación y se realizó una identificación sistemática final con los péptidos de las SEQ ID NOs: 102-111. Los resultados se muestran en la Figura 8. Los péptidos que estimulaban la producción de IL-2 mediante los linfocitos T de cada uno de los donantes 1-20 están sombreados en la Figura 8.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra que una sustitución de alanina en lugar de I493, R494, N495, G496, L498, L499, R500, V501 o Y502 reduce la respuesta de los linfocitos T, tal como se mire mediante la producción de IL-2, en comparación con la respuesta para el péptido de tipo silvestre (WT).

Cada aminoácido distinto de alanina en el péptido de tipo silvestre IRNGALLRVYVPRSS (SEQ ID NO: 106) estaba sustituido con alanina. Las muestras de los donantes sin tratamiento previo se estimularon con LMB9 durante 17 días y se sometieron a ensayo usando ELISpot de IL-2 como se ha descrito en el Ejemplo 3. La Tabla 5 resume los datos de la identificación sistemática de seis muestras frente a los péptidos sustituidos.

TABLA 5

péptido	Donantes					
	071509wb	091510aph	050710aph	101910aph	121709aph	030211aph
WT SEQ ID NO: 106	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
I493A	86 %	13 %	0 %	111 %	5 %	6 %
R494A	133 %	0 %	2 %	62 %	2 %	12 %
N495A	117 %	25 %	2 %	67 %	1 %	35 %
G496A	97 %	58 %	18 %	35 %	14 %	18 %
L498A	24 %	4 %	0 %	57 %	5 %	0 %
L499A	30 %	0 %	0 %	26 %	9 %	6 %
R500A	1 %	4 %	24 %	38 %	13 %	24 %
V501A	43 %	0 %	7 %	31 %	27 %	0 %
Y502A	3 %	4 %	18 %	37 %	37 %	12 %
V503A	62 %	58 %	47 %	37 %	36 %	41 %
P504A	53 %	125 %	49 %	32 %	56 %	206 %

péptido	Donantes					
	071509wb	091510aph	050710aph	101910aph	121709aph	030211aph
R505A	36 %	83 %	87 %	21 %	95 %	147 %
S506A	114 %	138 %	44 %	54 %	55 %	312 %
S507A	119 %	96 %	51 %	40 %	100 %	235 %

Como se muestra en la Tabla 5, para las seis muestras, una sustitución o más disminuía la respuesta a un 10-30 % de la respuesta para WT. Para cinco de seis muestras, una sustitución o más disminuía la respuesta a menos de un 10 % de la respuesta para WT. La sustitución I493A, R494A, N495A, G496A, L498A, L499A, R500A, V501A o Y502A reduce la respuesta de los linfocitos T en un 70 % o más en comparación con la respuesta para WT en al menos tres de las seis muestras. La Tabla 5 muestra el porcentaje de respuesta de la respuesta obtenida con el péptido WT.

Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra que las SEQ ID NOs: 38, 39, 44, 45, 81, 82, 86-88, 97, 98, 105-108, y 123-125 contienen epítomos de linfocitos T.

Se realizaron identificaciones sistemáticas finas de todas las combinaciones positivas para 50 donantes para determinar la región o regiones inmunodominantes. Para cada donante, se calculó el número total de SFC, y cada parte relativa del péptido del número total de SFC se calculó y se normalizó de acuerdo con la fórmula (I) que sigue a continuación, en la que D representa donante, y x representa uno de los 50 donantes, P representa péptido, y representa uno de los péptidos de las SEQ ID NOs: 31-141, y S_y representa el número de SFC para el péptido y:

$$Para\ cada\ D_x: P_y = \frac{S_y}{\sum_{y=1}^{111} S_y}$$

(I).

El valor normalizado representa el nivel inmunogenicidad de cada péptido, y el cálculo de estos valores relativos para 50 donantes se muestra en la Figura 9. La Figura 9 muestra que los siguientes péptidos contienen epítomos de linfocitos T: SEQ ID NOs: 38, 39, 44, 45, 81, 82, 86, 87, 88, 97, 98, 105, 106, 107, 108, 123, 124, y 125.

Los péptidos más inmunogénicos en el dominio III se seleccionaron basándose en los datos que se presentan en la Figura 9. Los péptidos, el número de donantes y pacientes que respondían al péptido, en las secuencias comunes a los péptidos se presentan en la Tabla 6. Los pacientes en la Tabla 6 se trataron previamente con PE38, y la respuesta que se muestra en la Tabla 6 es una respuesta de memoria. En la Tabla 6, una respuesta se define como un 5 % de las SFC del donante o del paciente que responden al péptido.

TABLA 6

Epítopo N.º	combinación	Número de donantes que respondieron al péptido (n = 50)	Número de pacientes que respondieron al péptido (n = 12)	Secuencia	Secuencia común
1	15 16	3	6	RGRIRNGALLRVYVP (SEQ ID NO: 105)	IRNGALLRVYVP (SEQ ID NO: 190)
		5	5	IRNGALLRVYVPRSS (SEQ ID NO: 106)	
		4	6	GALLRVYVPRSSLPG (SEQ ID NO: 107)	
		5	7	LRVYVPRSSLPGFYR (SEQ ID NO: 108)	
2	14	4	5	WRGFYIAGDPALAYG (SEQ ID NO: 97)	FYIAGDPALAYG (SEQ ID NO: 192)
		5	3	FYIAGDPALAYGYAQ (SEQ ID NO: 98)	
3	11	4	4	TVERLLQAHRQLEER (SEQ ID NO: 81)	RLLQAHRQLEER (SEQ ID NO: 193)
		3	4	RLLQAHRQLEERGYV (SEQ ID NO: 2)	

ES 2 635 416 T3

Epítipo N.º	combinación	Número de donantes que respondieron al péptido (n = 50)	Número de pacientes que respondieron al péptido (n = 12)	Secuencia	Secuencia común
4	19	1 2 2	0 4 4	GPEEEGGRLETILGW (SEQ ID NO: 123) EEGGRLETILGWPLA (SEQ ID NO: 124) GRLETILGWPLAERT (SEQ ID NO: 125)	EEGGRLETILGW (SEQ ID NO: 194) GRLETILGWPLA (SEQ ID NO: 195)
5	12	4 2 3	4 5 3	GYVFGYHGTFLEAA (SEQ ID NO: 86) FVGYHGTFLEAAQSI (SEQ ID NO: 87) YHGTFLEAAQSIIVFG (SEQ ID NO: 88)	FVGYHGTFLEAA (SEQ ID NO: 196) YHGTFLEAAQSI (SEQ ID NO: 197)

Ejemplo 11

5 Este ejemplo demuestra que las sustituciones R421A, L422A, L423A, A425G, R427A, L429A, Y470A, I471A, A472G, P475A, A476G, L477A, I493A, N495A, R494A, L498A, L499A, R500A, V501A, Y502A, V503A, R505A, L508A, o P509A como se define por referencia a la SEQ ID NO: 1, reducen la inmunogenicidad de PE.

10 La SEQ ID NO: 106 corresponde a las posiciones 493-507 del resto de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 107 corresponde a las posiciones 496-510 del resto de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 97 corresponde a las posiciones 466-480 del resto de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la SEQ ID NO: 81 corresponde a las posiciones 418-432 del resto de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Cada aminoácido en la SEQ ID NO: 106 y la SEQ ID NO: 107 estaba sustituido con alanina. Las muestras de donantes y pacientes se estimularon and con LMB9 durante 17 días y se sometieron a ensayo usando ELISpot de IL-2 como se ha descrito en el Ejemplo 3. La Tabla 7 (SEQ ID NO: 106), la Tabla 8 (SEQ ID NO: 107), la Tabla 9 (SEQ ID NO: 97), y la Tabla 10 (SEQ ID NO: 81) resumen los datos (% de la respuesta al péptido de tipo silvestre (WT)) a partir de la identificación sistemática de las
15 muestras frente a los péptidos sustituidos.

TABLA 7 (SEQ ID NO: 106)

Donante/ Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sin péptido	0 %	0 %	0 %	4 %	0 %	9 %	42 %	0 %	1 %	17 %	1 %	0 %
WT76	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
I493A	86 %	13 %	0 %	5 %	6 %	20 %	32 %	110 %	36 %	71 %	76 %	0 %
R494A	133 %	0 %	2 %	2 %	12 %	26 %	23 %	111 %	2 %	88 %	94 %	1 %
N495A	117 %	25 %	2 %	1 %	35 %	40 %	42 %	102 %	31 %	72 %	72 %	1 %
G496A	97 %	58 %	18 %	14 %	18 %	37 %	39 %	96 %	63 %	44 %	99 %	8 %
L498A	24 %	4 %	0 %	5 %	0 %	80 %	23 %	6 %	4 %	16 %	31 %	1 %
L499A	30 %	0 %	0 %	9 %	6 %	31 %	39 %	30 %	1 %	15 %	57 %	1 %
R500A	1 %	4 %	24 %	13 %	24 %	26 %	19 %	1 %	2 %	20 %	6 %	1 %
V501A	43 %	0 %	7 %	27 %	0 %	46 %	94 %	25 %	13 %	27 %	48 %	4 %
Y502A	3 %	4 %	18 %	37 %	12 %	23 %	42 %	5 %	23 %	20 %	0 %	6 %
V503A	62 %	58 %	47 %	36 %	41 %	63 %	55 %	35 %	68 %	27 %	43 %	33 %
P504A	53 %	125 %	49 %	56 %	206 %	60 %	55 %	35 %	122 %	26 %	18 %	63 %
R505A	36 %	83 %	87 %	95 %	147 %	131 %	123 %	36 %	127 %	23 %	30 %	83 %

ES 2 635 416 T3

Donante/ Paciente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
S506A	114 %	138 %	44 %	55 %	312 %	214 %	104 %	101 %	107 %	55 %	82 %	56 %
S507A	119 %	96 %	51 %	100 %	235 %	137 %	97 %	71 %	69 %	83 %	84 %	45 %

Como se muestra en la Tabla 7, la sustitución de I493A, R494A, N495A, L498A, L499A, R500A Y502A, V501A, o Y502A reduce la respuesta de los linfocitos T en un 70 % o más en comparación con la respuesta para el péptido WT.

5

TABLA 8 (SEQ ID NO: 107)

% de WT	1	2	3	4	5	6	7
Sin péptido	0 %	0 %	7 %	0 %	18 %	9 %	1 %
wt 77	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
G496A	29 %	51 %	123 %	126 %	58 %	112 %	37 %
A497G	103 %	68 %	126 %	102 %	108 %	129 %	71 %
L498A	61 %	38 %	140 %	7 %	20 %	13 %	43 %
L499A	46 %	24 %	61 %	33 %	26 %	73 %	1 %
R500A	59 %	31 %	124 %	1 %	16 %	1 %	6 %
V501A	7 %	18 %	28 %	18 %	26 %	49 %	15 %
Y502A	14 %	1 %	9 %	4 %	25 %	8 %	0 %
V503A	17 %	1 %	9 %	15 %	39 %	49 %	1 %
P504A	46 %	32 %	41 %	38 %	43 %	12 %	36 %
R505A	7 %	1 %	22 %	28 %	24 %	39 %	2 %
S506A	68 %	42 %	50 %	107 %	93 %	122 %	48 %
S507A	35 %	37 %	224 %	86 %	106 %	96 %	60 %
L508A	8 %	0 %	15 %	73 %	99 %	88 %	46 %
P509A	10 %	4 %	16 %	87 %	101 %	119 %	72 %
G510A	113 %	144 %	210 %	116 %	114 %	114 %	104 %

Como se muestra en la Tabla 8, la sustitución de L498A, L499A, R500A, V501A, Y502A, V503A, R505A, L508A, o P509A reduce la respuesta de los linfocitos T en un 70 % o más en comparación con la respuesta para el péptido WT.

10

TABLA 9 (SEQ ID NO: 97)

% de WT	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	13
Sin péptido	0 %	6 %	13 %	1 %	13 %	43 %	26 %	0 %	29 %	47 %	0 %
WT67	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
F469A	80 %	11 %	104 %	35 %	97 %	60 %	88 %	53 %	68 %	60 %	81 %
Y470A	61 %	6 %	48 %	67 %	29 %	29 %	16 %	15 %	97 %	92 %	68 %
I471A	17 %	7 %	20 %	20 %	22 %	25 %	12 %	17 %	43 %	55 %	35 %
A472G	37 %	20 %	84 %	75 %	46 %	31 %	19 %	0 %	60 %	76 %	60 %
P475A	72 %	73 %	34 %	57 %	15 %	59 %	16 %	60 %	40 %	70 %	38 %
A476G	75 %	110 %	207 %	26 %	67 %	47 %	35 %	24 %	122 %	115 %	32 %

ES 2 635 416 T3

% de WT	1	2	3	4	5	6	7	9	11	12	13
L477A	54 %	92 %	25 %	42 %	26 %	43 %	16 %	15 %	67 %	71 %	52 %
A478G	80 %	96 %	134 %	24 %	63 %	41 %	98 %	33 %	84 %	66 %	58 %
Y479A	114 %	250 %	108 %	117 %	71 %	82 %	21 %	58 %	110 %	94 %	138 %

Como se muestra en la Tabla 9, la sustitución de Y470A, I471 A, A472G, P475A, A476G, o L477A reduce la respuesta de los linfocitos T en un 70 % o más en comparación con la respuesta para el péptido WT.

5

TABLA 10 (SEQ ID NO: 81)

% de WT	1	2	3	4	5	6	7	8
Sin péptido	13 %	14 %	7 %	0 %	1 %	0 %	1 %	2 %
WT51	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
R421A	22 %	12 %	26 %	23 %	87 %	2 %	5 %	19 %
L422A	31 %	10 %	16 %	29 %	18 %	0 %	1 %	30 %
L423A	8 %	10 %	6 %	47 %	21 %	11 %	3 %	7 %
A425G	57 %	16 %	68 %	105 %	51 %	4 %	6 %	112 %
R427A	37 %	10 %	35 %	78 %	81 %	1 %	2 %	54 %
L429A	28 %	19 %	124 %	63 %	64 %	38 %	36 %	163 %
E430A	112 %	26 %	99 %	100 %	100 %	242 %	73 %	112 %
R432A	65 %	57 %	142 %	105 %	92 %	87 %	69 %	228 %

Como se muestra en la Tabla 10, la sustitución de R421A, L422A L423A, A425G, R427A, o L429A reduce la respuesta de los linfocitos T en un 70 % o más en comparación con la respuesta para el péptido WT.

10 Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra que las sustituciones de Y439A, H440A, F443A, L444A, A446G, A447A, I450A, R551A, L552A, T554A, I555A, L556A o W558A, como se define por referencia a la SEQ ID NO: 1, reducen la inmunogenicidad de PE.

15

Un péptido de 18-mer (GPEEEGGRLETILGWPLA) (SEQ ID NO: 198) se sintetizó para que incluyera los restos de los aminoácidos de ambas SEQ ID NOs: 123 y 124. Un péptido de 18-mer (FVG YHGTFLEAAQSIVFG) (SEQ ID NO: 199) se sintetizó para que incluyera los restos de los aminoácidos de ambas SEQ ID NOs: 87 y 88. La SEQ ID NO: 198 corresponde a las posiciones 544-561 del resto de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y la SEQ ID NO: 199 corresponde a las posiciones 436-453 del resto de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Cada aminoácido en la SEQ ID NO: 198 y 199 estaba sustituido con alanina. Las muestras de donantes y pacientes se estimularon con LMB9 durante 17 días y se sometieron a ensayo usando ELISpot de IL-2 como se ha descrito en el Ejemplo 3. La Tabla 11 (SEQ ID NO: 198) y la Tabla 12 (SEQ ID NO: 199) resumen los datos (% de la respuesta para el péptido de tipo silvestre (WT)) a partir de la identificación sistemática de las muestras frente a los péptidos sustituidos.

25

TABLA 11

% de WT	1	2	3	4	5	6	7
Sin péptido	9 %	2 %	3 %	4 %	3 %	35 %	25 %
WT 93-94	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
E547A	18 %	254 %	73 %	120 %	122 %	73 %	106 %
E548A	24 %	170 %	58 %	98 %	86 %	102 %	207 %
R551A	6 %	2 %	62 %	70 %	42 %	40 %	67 %
L552A	44 %	10 %	54 %	35 %	11 %	85 %	51 %
T554A	9 %	5 %	77 %	133 %	130 %	110 %	95 %
I555A	176 %	119 %	111 %	25 %	15 %	63 %	36 %

ES 2 635 416 T3

% de WT	1	2	3	4	5	6	7
L556A	235 %	3 %	24 %	10 %	13 %	35 %	83 %
W558A	200 %	13 %	20 %	26 %	7 %	46 %	54 %
P559A	197 %	208 %	24 %	69 %	37 %	65 %	121 %
L560A	321 %	162 %	81 %	132 %	117 %	46 %	138 %

Como se muestra en la Tabla 11, la sustitución de R551A, L552A, T554A, I555A, L556A y W558A reduce la respuesta de los linfocitos T en un 70 % o más en comparación con la respuesta para el péptido WT.

5

TABLA 12

% de WT	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Sin péptido	0 %	4 %	0 %	0 %	1 %	2 %	10 %	9 %	0 %	1 %	18 %
WT 57-58	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
F436A	98 %	7 %	57 %	159 %	89 %	67 %	41 %	123 %	103 %	103 %	94 %
V437A	78 %	81 %	84 %	130 %	96 %	77 %	102 %	148 %	97 %	95 %	103 %
G438A	52 %	79 %	67 %	78 %	118 %	81 %	98 %	68 %	71 %	88 %	97 %
Y439A	96 %	17 %	22 %	21 %	125 %	88 %	110 %	154 %	79 %	97 %	111 %
H440A	12 %	6 %	11 %	95 %	108 %	80 %	90 %	102 %	46 %	113 %	105 %
T442A	84 %	31 %	77 %	151 %	93 %	77 %	59 %	127 %	48 %	102 %	79 %
F443A	0 %	7 %	2 %	40 %	1 %	13 %	20 %	7 %	5 %	2 %	17 %
L444A	54 %	140 %	69 %	74 %	55 %	11 %	14 %	0 %	9 %	4 %	32 %
A446G	40 %	119 %	80 %	47 %	107 %	97 %	69 %	16 %	80 %	37 %	120 %
A447G	104 %	103 %	65 %	57 %	118 %	73 %	43 %	7 %	19 %	28 %	98 %
S449A	126 %	104 %	98 %	93 %	128 %	116 %	163 %	200 %	23 %	65 %	87 %
I450A	159 %	124 %	138 %	130 %	108 %	42 %	31 %	11 %	2 %	66 %	20 %
V451A	127 %	121 %	119 %	162 %	142 %	94 %	137 %	50 %	82 %	117 %	119 %
F452A	126 %	156 %	119 %	154 %	103 %	169 %	104 %	123 %	99 %	104 %	116 %

Como se muestra en la Tabla 12, la sustitución de Y439A, H440A, F443A, L444A, A446G, A447A, o I450A reduce la respuesta de los linfocitos T en un 70 % o más en comparación con la respuesta para el péptido WT.

10 **Ejemplo 13**

Este ejemplo demuestra la identificación de epítomos de linfocitos T en PE.

15 Basándose en los resultados obtenidos en los Ejemplos 4-12, las secuencias de aminoácidos que se presentan en la Tabla 13 se identificaron como epítomos de linfocitos T de PE.

TABLA 13

SEQ ID NO:	Restos de aminoácidos con referencia a la SEQ ID NO: 1	Secuencia
200	276-287	RQPRGWLEQLEQC
3	294-305	LVALYLAARLSW
193	421-432	RLLQAHRQLEER
199	436-453	FVGYHGTFLEAAQSIVFG

SEQ ID NO:	Restos de aminoácidos con referencia a la SEQ ID NO: 1	Secuencia
192	469-480	FYIAGDPALAYG
201	493-510	IRNGALLRVYVPRSSLPG
202	547-560	EEGGRLETILGWPL

Ejemplos 14-16

Para los Ejemplos 14-16 se usaron los siguientes materiales y métodos:

5 *Recogida, almacenamiento, y aislamiento de ARN de Muestra de Sangre Completa del Paciente:* Se obtuvieron muestras de sangre de 6 pacientes que se trataron con inmunotoxinas recombinantes (RIT). Se recogieron muestras de 2,5 ml de sangre en tubos PAXGENE que contenían un detergente catiónico y sales de aditivo (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Suiza), se mezcló minuciosamente mediante el volteado del tubo suavemente 4-6 veces y se incubó a temperatura ambiente 10 horas, y a continuación se almacenaron a -80 °C. El ARN intracelular de las muestras de sangre completa del paciente se purificó usando el Kit de ARN de Sangre PAXGENE (PreAnalytiX) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenó a -80 °C.

15 *Síntesis de ADNc de Cadena Pesada y de Cadena Ligera, amplificación y ensamblaje de PCR de genes de ScFv:* Un sitio de restricción enzimática o conector de vector se conectó (Tabla 15) con algunos cebadores. Los repertorios de cadena pesada y los repertorios de cadena ligera se prepararon por separado y se conectaron con un conector para proporcionar la formación de ScFv. Los repertorios de cadena pesada se prepararon a partir de IgG con linfocitos B maduros. La síntesis de la primera hebra del ADNc se realizó usando un kit de síntesis de la primera hebra de ADNc (GE Healthcare, NJ) con un cebador de la región constante de IgG: HulGG1-4CH1FOR (Tabla 15).
20 Los repertorios de la cadena ligera se prepararon a partir de genes de Vk usando un cebador de región constante κ : HuGkFOR (Tabla 15). Se añadieron cebadores de 40 pmoles en 15 μ l de mezcla de reacción para la síntesis del ADNc.

25 Los genes de V_H y V_k se amplificaron por separado mediante un proceso de tres etapas se usando la producción de síntesis de la primera hebra del ADNc. El cebador de la región constante de IgG: HulGG1-4CH1FOR y una mezcla equimolar de los retrocebadores apropiados de V_H humano basados en familias (Tabla 15) se usaron en la primera etapa de PCR para cubrir el gen de V_H en el ARN intracelular de las muestras de sangre completa del paciente. Un cebador de la región constante de κ : HuGkFOR y los retrocebadores apropiados de V_k humano basados en familias (Tabla 15) se usaron para el gen de V_k . La primera etapa de la PCR se realizó usando la polimerasa de alta fidelidad PHUSION (New England Biolabs, Ipswich, MA) en un volumen final de 50 μ l de mezcla de reacción con 10 pmoles de cada cebador de acuerdo con la recomendación del fabricante.

35 La polimerasa de alta fidelidad PRIMESTAR (Takara, Kyoto, Japón) se usó para la segunda etapa de PCR, PCR de Corte y Empalme mediante Extensión del Solapamiento (SOE), y la última etapa para la preparación de inserciones con 10 pmoles de cada cebador de acuerdo con la recomendación del fabricante. La secuencia de 5'-GCC CAG CCG GCC ATG GCC-3' (SEQ ID NO: 185) que incluía un sitio NcoI (subrayado) se conectó con retrocebadores de V_H humano para retrocebadores nco de V_H (Tabla 15). El vector pCANTAB se usó para la construcción de biblioteca de fagos. La secuencia de 5'-ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC-3' (SEQ ID NO: 186) que incluía un conector pCANTAB se conectó a cebadores directos de J_H humano para cebadores de conector directo de J_H humano. Los retrocebadores de nco de V_H humano y los cebadores de conector director de J_H humano se usaron en la segunda PCR para añadir un sitio Nco I en la parte posterior del gen de V_H y un conector pCANTAB director del gen de V_H .

45 En la segunda etapa para amplificar el gen de V_k , la secuencia de 5'-GGA TCC GGT-GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC-3' (SEQ ID NO: 187) que incluía un conector pCANTAB se conectó a retrocebadores de V_k humano para cebadores de retroconector de V_k . La secuencia de 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC-3' (SEQ ID NO: 184) que incluía un sitio NotI (con doble subrayado) se conectó a cebadores directos de J_k humano para cebadores Not directos de J_k humano. Los retrocebadores de V_k humano y los cebadores directos de J_k humano se usaron en la segunda PCR para añadir un sitio Not I directo y un conector pCANTAB en la parte posterior del gen de V_k .

55 Los genes de V_H y V_k se prepararon en la tercera etapa por separado usando (a) el par de retrocebadores Nco de V_H humano y un cebador de conector pCANTAB del conector de R' (Tabla 15) para el gen de V_H , y (b) el par de cebadores de los cebadores not directos de J_k humano y un cebador de conector de pCANTAB del conector de F' (Tabla 15) para el gen de V_k .

Los cebadores del conector de R' y del conector de F' que se usaron en la tercera etapa eran cebadores complementarios. Los genes de V_H y V_K se combinaron para proporcionar una formación de ScFv usando SOE-PCR. Por último, el fragmento de la biblioteca de ScFv se amplificó usando los cebadores VHlgGFOR y VLREV (Tabla 15) para la preparación de la inserción.

5 *Construcción de Biblioteca de Fagos:* El fragmento de ScFv amplificado se digirió con NcoI y NotI, y se subclonó en pCANTAB 5E digerido con las mismas enzimas para la construcción de la biblioteca de ScFv usando T4 ligasa. La solución de ligamiento se purificó por extracción con columna de centrifugación QIAQUICK (Qiagen, Valencia, CA), y se volvió a suspender en agua. La concentración resultante era de aproximadamente 50 ng/ml. Se sometieron a
10 electroporación muestras de 4 µl en 50 µl de células electrocompetentes para TG1 (Lucigen, WI) by usando un pulsador genético y una unidad controladora del pulso (Bio-Rad Laboratories) y se repitió 6 veces para una biblioteca de tamaño grande. Las células se incubaron en 6 ml de SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 1 h a 37 °C con agitación a aproximadamente 250 rpm. Se recogió una muestra de 20 µl, se diluyó, y se sembró en una placa de TYE ampicilina para calcular el tamaño de la biblioteca. El medio 2YT en una cantidad de 6 ml con 200 µg/ml de ampicilina y glucosa al 4 % se añadió y se incubó durante otra 1 h. El medio se preparó hasta 200 ml con medio 2YT
15 con 100 mg/ml de ampicilina y glucosa al 2 %. Las células se cultivaron a DO₆₀₀ = 0,4 y se infectaron con 10¹¹ pfu de fago a auxiliar M13K07 (New England Biolaboratories) con agitación a 250 rpm durante 30 min después de reposo durante 30 min. Las células se recogieron durante 5 min a 5.000 rpm en un rotor de GSA y se volvieron a suspender en medio 2YT en una cantidad de 100 ml con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina durante una noche
20 a 30 °C con agitación a 250 rpm.

Los fagos se precipitaron a partir del sobrenadante con 1/5 de volumen de PEG/NaCl (polietilenglicol 6000 al 20 %, NaCl 2,5 M) y se volvieron a suspender con medio 2YT. El título de la biblioteca de fagos se determinó preparando diluciones en serie de 10 µl de fagos y añadiendo 90 µl de células TGI, DO₆₀₀ = 0,4, se sembraron en agar LB
25 suplementado con 100 µg/ml de Amp y glucosa al 1 %. El número de colonias se determinó después del crecimiento durante una noche, y el título se calculó.

Selección de Biblioteca de Fagos: LMB-9 (B3(dsFv)-PE38, específico para un antígeno de Lewis Y) se usó como antígeno para selección de biblioteca de fagos. LMB9 se biotiniló usando EZ-Conector sulfo-NHS-Biotina (Thermo Scientific, Rockford, IL) a una proporción molar de 50:1, y el número de grupos de biotina en cada LMB9-biotina se determinó usando el kit de cuantificación de biotina (Thermo Scientific, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 350 ml de fagos y perlas magnéticas modificadas con estreptavidina (DYNABEADS MYONE Streptavidin T1, diámetro de 1 µm, capacidad y unión de Ig biotinilada 40-50 µg mg⁻¹, hidrófobo, perlas activadas con tosilo (Invitrogen)) se bloquearon previamente en un 3 % de BSA/PBST (tween-20 al 0,1 %). El fago se aplicó para desección con perlas.
30
35

Una rejilla magnética se usó para separar las perlas de la fase líquida haciendo que las perlas se llegaran a inmovilizar a lo largo del lado del tubo. El tampón de bloqueo se retiró, y las perlas se volvieron a suspender en solución de fago y se incubaron a temperatura ambiente en rotor durante 30 min. La solución de fagos se desplazó a otro tubo con perlas bloqueadas previamente para desección adicional. La desección se repitió con 1 mg de perlas dos veces y 2 mg de perlas una vez. El fago se desplazó a un tubo bloqueado previamente, y se añadió antígeno de LMB9-biotina biotinilado para permitir que se formaran complejos de fago-antígeno-biotina con LMB9-biotina en una cantidad de 10 µg para la primera ronda y 5 µg para rondas posteriores. La solución de reacción se incubó a temperatura ambiente en rotor durante 2 h y se retiró a un tubo con 2 mg de perlas durante un periodo de
40 de incubación adicional de 45 min en rotor. El sobrenadante se retiró, y las perlas se lavaron 12 veces usando PBST. El fago se liberó de las perlas mediante la adición de HCl 0,1 M frío en una cantidad de 1 µl, y el pH se neutralizó con 200 µl de solución de Tris-HCl (pH 8,0). Este es el rendimiento de la selección, y se rescató para rondas de selección adicionales, y la titulación se calculó. El fago de salida en una cantidad de 0,6 µl se usó para infectar 5 ml de TG1 (DO₆₀₀ = 0,4) para su rescate.
45
50

ELISA de Fago y Secuenciación de Clon de Fago: Después de tres o cuatro rondas de selección y rescate de fagos, se seleccionaron 198 clones individuales a partir de la ronda final de selección para análisis adicional. Un clon de señal se retiró a una placa de 96 pocillos de fondo redondo con 150 µl de medio 2YT (100 µg/ml de ampicilina, glucosa al 2 %) durante 4 h a 37 °C con agitación a 250 rpm, y se añadieron 10⁸ pfu de fago auxiliar de M13K07 en
55 50 µl de medio 2YT (100 µg/ml de ampicilina, glucosa al 2 %) en el pocillo con agitación a 250 rpm durante 30 min después de reposar durante 30 min. Las células se recogieron mediante 2700 rpm durante 10 min con inserciones para placas de 96 pocillos y se volvieron a suspender en medio 2YT en una cantidad de 200 µl con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina durante una noche a 30 °C con agitación a 250 rpm. El sedimento se volvió a suspender con 100 µl de medio 2YT con 100 µg/ml de ampicilina, glucosa al 2 %, y glicerol al 30 % y se almacenó a
60 -80 °C para reserva. Los fagos se precipitaron a partir del sobrenadante para ELISA de fagos con 2700 rpm durante 10 min. Una placa NUNC MAXISORP de fondo plano de 96 pocillos (Nunc USA, Rochester, NY) se revistió con LMB9 (5 µg/ml en PBS) durante una noche a 4 °C. La placa se lavó y se bloqueó con leche sin grasa al 2 % (señalización celular). El sobrenadante con fago (50 µl) y leche al 2 % (50 µl) se añadieron y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBST, y se añadió el anti-M13 conjugado con peroxidasa
65 (1:1000, GE Healthcare, Waukesha, WI) durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con Solución Salina Tamponada con Fosfato y Tween 20 (PBST), y se añadió sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB)

(Thermo Scientific, Rockford, IL) durante 15 min. Los resultados se leyeron en un espectrofotómetro a 450 nm para determinar los clones positivos y negativos. El clon positivo se recogió para aislamiento de fagos a pequeña escala a partir del pocillo apropiado de la placa de reserva, y la secuenciación se realizó usando el Kit de Secuenciación de Ciclos BIGDYE Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los clones con la misma secuencia se retiraron, y las secuencias resultantes se alinearon con el programa IMG_T/V-Quest (www.imgt.org/IMG_T/V-quest).

ICC-ELISA de Competición: El fago-anticuerpo se preparó con el método mencionado anteriormente con un cultivo a escala de 20 ml. La dilución del fago-anticuerpo se determinó con ELISA. Se añadieron 50 µl/pocillo de anticuerpo SS1P, 1 µg/ml en leche sin grasa al 2 %, a placas de ELISA revestidas durante una noche a 4 °C con rFc-mesotelina en una cantidad de 50 µl/pocillo a una concentración de 4 µg/ml en PBS. La placa se lavó 3 veces con PBST; se añadió fago-anticuerpo con diversas diluciones y se detectó usando anti-M13 conjugado con HRP y sustrato de TMB. La dilución del fago-anticuerpo se determinó mediante una curva de dilución, y la A450 deseada se estableció en aproximadamente 1,0. Un ensayo de ICC-ELISA de competición se realizó para determinar el epítipo de unión a fago-anticuerpo del antígeno PE38 usando suero de paciente, PE38 sin Fv, o la mutación de señal en PE38. El fago-anticuerpo se mezcló con dilución es en serio el mutante individual durante una noche a 4 °C y se añadió a la placa de ELISA de combinación de SS1P-rFc-Mesotelina. La competición del mutante individual para la unión de fago-anticuerpo a SS1P se determinó midiendo la unión restante del fago-anticuerpo usando anti-M13 conjugado con HRP. El efecto de competición se normalizó con respecto a la unión a HA22-LR en el que PE38 carecía de una sustitución.

Antigenicidad del Suero: La unión de HA22 o HA22 sustituido a anticuerpos en sueros humanos se analizó en un ensayo de desplazamiento. Los sueros humanos se obtuvieron con el protocolo 10C0066. Se añadió mesotelina-rFc a la placa de ELISA (100 ng en 50 µl de PBS/pocillo) y se incubó durante una noche a 4 °C. Después de lavado, se añadió antimesotelina/SS1P (100 ng en 50 µl de tampón de bloqueo/pocillo) durante 1 h para capturar los anticuerpos anti-PE38 humanos no unidos. En tubos separados, los sueros (dilución es de 97 a 30658 veces) se mezclaron con 2 µg/ml de HA22 o HA22 sustituido y se incubaron durante una noche a 4 °C. Después de lavar la placa, se transfirieron 50 µl de mezclas de inmunotoxina-anticuerpo a cada pocillo. Los anticuerpos humanos no unidos a HA22 o HA22 sustituidos se capturaron con SS1P y se detectaron con Fc de IgG anti-humana conejo conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), seguido del kit de sustrato de TMB (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA). Las curvas de unión se ajustaron usando un modelo de curva logística de cuatro parámetros con SoftMaxPro 4.0 (Molecular Devices). Los valores de la CI₅₀ indican la concentración de RIT inhibe un 50 % de la reactividad del anticuerpo con SS1P.

Estadísticas: Se usó el método no paramétrico de Mann-Whitney; p < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra el aislamiento y la secuenciación de ScFv humano específico para PE38.

Las muestras de sangre se obtuvieron de 6 pacientes que se trataron con inmunotoxinas recombinantes (RIT) que contenían PE38 (Tabla 14). El ARN se aisló de muestras de sangre usando Kits de ARN de Sangre PAXGENE (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Suiza). La primera hebra del ADNc se sintetizó a partir de ARN usando cebadores con la región constante apropiada (Tabla 15). Las bandas individuales del tamaño corregido para ADNc de V_H y V_K se obtuvieron usando la primera hebra de ADNc como molde. Los fragmentos de V_H y V_L se amplificaron de forma individual en tres etapas. En el fragmento se añadieron el sitio de enzima de restricción y conector. Se combinaron 100 ng de los fragmentos de V_H y V_L en una Reacción en Cadena de la Polimerasa de Extensión de Solapamiento (SOE-PCR) para la formación de scFv. El fragmento de scFv se digirió con Nco I y Not I, y se subclonó en pCANTAB 5E digerido con las mismas enzimas para la construcción de una biblioteca de scFv.

TABLA 14

Biblioteca	Enfermedad	RIT Usadas	Tamaño de la Biblioteca X 10 ⁸ clones independientes	Tamaño de la Biblioteca de Fagos x 10 ¹³ fpu/ml	Tasa de clones positivos después de la cuarta ronda	Análisis de secuencias de ADN	Clon Independiente
L1	ATL	LMB2	1,08	2,35	174/188	170	14
L2	HCL	HA22	1,27	2,3	177/188	176	20
L6	HCL	BL22	1,15	2,44	14/211	14	3

ES 2 635 416 T3

Biblioteca	Enfermedad	RIT Usadas	Tamaño de la Biblioteca X 10 ⁸ clones independientes	Tamaño de la Biblioteca de Fagos x 10 ¹³ fpu/ml	Tasa de clones positivos después de la cuarta ronda	Análisis de secuencias de ADN	Clon Independiente
L7	Mesotelioma Pleural	SS1P	1,05	2,06	172/190	172	4
L8	Mesotelioma Pleural	SS1P	0,73	2,15	98/190	98	63
L9	Cáncer de pulmón	SS1P	0,86	2,29	80/190	80	2
						Total: 710	103

TABLA 15

SEQ ID NO:	<i>Síntesis de la primera hebra de ADNc</i>
	<i>Cebador de la región constante de cadena pesada humana</i>
146	HulgG1-4CH1FOR 5' GTC CAC CTT GGT GTT GCT GGG CTT 3'
	<i>Cebador de la región constante de κ humana</i>
147	HuGκFOR 5' AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT 3'
	Primera etapa de PCR
	<i>Retrocebadores de VH humano</i>
148	HuVH1aBACK 5' CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG 3'
149	HuVH2aBACK 5' CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG 3'
150	HuVH3aBACK 5' GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG 3'
151	HuVH4aBACK 5' CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG 3'
152	HuVH5aBACK 5' GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC 3'
153	HuVH6aBACK 5' CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG 3'
	<i>Retrocebadores de Vk humano</i>
154	HuVk 1aBACK 5' GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC 3'
155	HuVk 2aBACK 5' GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC 3'
156	HuVk 3aBACK 5' GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC 3'
157	HuVk 4aBACK 5' GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC 3'
158	HuVk 5aBACK 5' GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC 3'
159	HuVk 6aBACK 5' GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC 3'
	Segunda etapa de PCR
	<i>Retrocebadores de Nco de V_H humano</i>

ES 2 635 416 T3

SEQ ID NO:	<i>Síntesis de la primera hebra de ADNc</i>
160	<i>HuVH1aBACKnco</i> 5' GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG 3'
161	<i>HuVH2aBACKnco</i> 5' GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTC AAC TTA AGG GAG TCT GG 3'
162	<i>HuVH3aBACKnco</i> 5' GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GG 3'
163	<i>HuVH4aBACKnco</i> 5' GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GG 3'
164	<i>HuVH5aBACKnco</i> 5' GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG CAG CTG TTG CAG TCT GC 3'
165	<i>HuVH6aBACKnco</i> 5' GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTA CAG CTG CAG CAG TCA GG 3'
	<i>Cebadores de conector directo de JH humano</i>
166	<i>ConectorHuJH12FOR</i> 5' ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC 3'
167	<i>ConectorHuJH3FOR</i> 5' ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC 3'
168	<i>ConectorHuJH45FOR</i> 5' ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC 3'
169	<i>ConectorHuJH6FOR</i> 5' ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC 3'
	<i>Cebadores de retroconector de Vk humano</i>
170	<i>ConectorHuVk 1aBACK</i> 5' GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CC 3'
171	<i>ConectorHuVk 2aBACK</i> 5' GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC GAT GTT GTG ATG ACT CAG TCT CC 3'
172	<i>ConectorHuVk, 3aBACK</i> 5' GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CC 3'
173	<i>ConectorHuVk 4aBACK</i> 5' GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC GAC ATC GTG ATG ACC CAG TCT CC 3'
174	<i>ConectorHuVk 5aBACK</i> 5' GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC 3'

SEQ ID NO:	Síntesis de la primera hebra de ADNc
175	<i>ConectorHuVk 6aBACK</i> 5' GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC 3'
	<i>Cebadores not directos de Jk humano</i>
176	<i>HuJk1BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC 3'
177	<i>HuJk2BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC 3'
178	<i>HuJk3BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC 3'
179	<i>HuJk4BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC 3'
180	<i>HuJk5BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC 3'
	Tercera etapa de PCR
181	<i>Conector de R'</i> 5' GCT TCC GCC ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC 3'
182	<i>Conector de F'</i> 5' GGC GGA GGC GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC 3'
	Preparación del fragmento de ScFv
183	<i>VHlgGFOR</i> 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC 3'
184	<i>VLREV</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC 3'

La inmunotoxina biotinilada LMB-9 (B3-Fv-PE38) se usó como el antígeno para la selección de Fvs que expresan fagos que se unían a PE38. Cada molécula de LMB-9 contenía 6 biotinas. Se obtuvieron 6 bibliotecas de anticuerpo humano mediante electroporaciones en TGI de *Escherichia coli* (*E. coli*) que contenía $7,3 \times 10^7$ - $1,27 \times 10^8$ clones de scFv de VH-VL (Tabla 15). La biblioteca de fago se rescató mediante superinfección con fago auxilia (Tabla 15), y 350 ml de cada biblioteca obtenía aproximadamente 7×10^{12} fragmentos de scFv presentados en la superficie del fago.

Se obtuvieron y se secuenciaron 710 clones de fago que contenían Fv. La secuenciación reveló que había 103 secuencias de cadena pesada humana y de cadena ligera kappa únicas presentes excepto para 2 clones que tenían la misma secuencia de la cadena ligera. Para mostrar que los Fvs se obtenían a partir de linfocitos B formando anticuerpos anti-inmunotoxina, se realizaron estudios de competición y mostraban que los antisueros inmunes bloqueaban la unión del fago a la porción PE38 de LMB-9, y ninguno de los clones se unían a la porción Fv de la inmunotoxina. La fuerza de la unión se midió a continuación usando un ICC-ELISA. 47 clones presentaban una unión débil y no se estudiaron adicionalmente. Los otros 56 clones se usaron para determinar los epítopos específicos de ser humano en PE38.

Ejemplo 15

Este ejemplo demuestra la ubicación de los epítopos de los linfocitos B humanos.

LMB-9 contiene ambos dominios II y III de PE. Para identificar el fago que solo se une al dominio III, se midió la unión de cada clon a HA22-LR, que solamente tenía el dominio III y carece del dominio II. Quince de los 56 fagos no

se pudieron unir a HA22-LR, lo que indica que los epítomos es reconocidos por estos 15 clones de fago estaban situados en el dominio II. Los 41 clones de fagos restantes se usaron para identificar los restos que forman los epítomos de linfocitos B en el dominio III midiendo su unión a proteínas sustituidas en las que los aminoácidos individuales en la superficie del dominio III de la proteína se cambiaron a partir de un aminoácido voluminoso grande por alanina o glicina. Estas sustituciones eliminaron las cadenas laterales voluminosas grandes que están implicadas en el reconocimiento y unión de anticuerpos. Los datos se muestran en la Figura 10 en la que los clones con poca unión (< 10 %) se muestran en celdas de color negro, y las proteínas sustituidas con una reactividad normal se muestran con células en blanco. Los resultados muestran que una sola sustitución disminuía la unión de muchos clones, indicando de ese modo que están en el mismo grupo de epítomos.

La posición de los restos que, cuando se sustituyen, reducía la unión al fago en > 90 % para diversos epítomos se muestra en la Tabla 16. Los aminoácidos asociados con cada epítomo de ser humano (H1, H2, H3, H4, H5 y H6) y de ratón (2c, 4a, 4b, 5, 6a, 6b, y 7) se muestran en la Tabla 16. El epítomo H1 humano contenía D403, R427, y E431. R427 y E431 pertenecían al epítomo 4a de ratón, y estos restos estaban implicados en la unión al anticuerpo tanto de ratón como de ser humano. El epítomo H2 de ser humano contenía los restos R467 y D463, que pertenecían al epítomo 2c de ratón, y E548 que pertenecían al epítomo 6a de ratón. Y481, L516, E522, y R551 eran epítomos específicos de ser humano. El epítomo H3 humano contenía solo a R458 que pertenecía al epítomo 4b de ratón. El epítomo H4 humano contenía R432 y R505. R432 pertenecía al epítomo 4a de ratón y R505 era un resto específico de ser humano. El epítomo H5 humano estaba formado por R490 y R576, que pertenecían al epítomo 5 de ratón. El epítomo H6 humano incluía a R538. R538 pertenece al epítomo 2c de ratón. D406, R412, R513, L597, Q592, y K590 eran epítomo sé específicos de ratón y no estaban implicados en la unión de epítomos de ser humano.

TABLA 16

Epítomos de ser humano	
H1	D403, R427, E431
H2	R551, E548, L516, E522, D463, D461, Y481, R467
H3	R458
H4	R505, R432
H5	R490, R576
H6	R538
Epítomos de ratón	
2c	D463, R467, R538
4a	R427, E431, R432
Epítomos de ratón	
4b	R406, R458
5	R412, R490, R576
6a	L597, R513, E548
6b	Q592
7	K590

Los clones de fago que reaccionan con el epítomo H1 estaban influidos por sustituciones en los restos D403, R427, y E431. Una sustitución de cualquiera de estos restos con alanina influía en gran medida en la unión de muchos fagos que reconocían el epítomo (Figura 10). Tal como se espera para las sustituciones que forman un epítomo, estos restos eran espacialmente adyacentes en el dominio III. El epítomo H2 era complejo. Los fagos que reaccionan con el epítomo H2 estaban influidos por sustituciones en 8 restos. La sustitución de R467 con alanina destruía la unión de seis de los ocho fagos que definían el epítomo H2. La sustitución del resto D463 evitaba la unión de cuatro fagos, la sustitución de Y481 evitaba la unión de tres fagos, la sustitución de R551 evitaba la unión de dos fagos, y la sustitución de los restos D461, L516, E522, o E548 evitaba la unión de un fago. Estructuralmente con estos restos residían en un área limitada y formaban un grupo. El epítomo H3 era reconocido por 2 fagos que se unen a R458. El

epítopo H4 era reconocido por 11 fagos y la unión se destruía con una sustitución de R505A. Una sustitución en R432, que estaba cerca de R505, influía en la unión de 1 de los 11 fagos. El epítopo H5 era reconocido por 4 fagos. La unión de los cuatro estaba influida por una sustitución en R490 y una sustitución en R576 influía en la unión de tres de cuatro fagos. Estos restos eran espacialmente adyacentes en el dominio III, incluso cuando estaban separados por 86 aminoácidos en la secuencia. Una sustitución en R538 eliminaba la unión de uno de dos fagos. En resumen, la sustitución de restos de superficie altamente expuesta con alanina identificaba los restos que se unen a los fagos que se unen al dominio III, lo que muestra que los epítopos estaban situados en distintos sitios en la superficie del dominio III.

10 **Ejemplo 16**

Este ejemplo demuestra la producción de una inmunotoxina recombinante de poca antigenicidad (RIT) para seres humanos.

15 La identificación de restos individuales que estaban implicados en la unión a antisueros humanos se usó para diseñar y hacer construcciones de inmunotoxinas con sustituciones que eliminaban la reactividad con la actividad citotóxicos también retenida por los antisueros humanos y se podían producir en cantidades suficientes para ser útiles. La mayoría de los casos, los restos se sustituyeron con alanina, porque su cadena lateral pequeña reacciona poco con los anticuerpos y normalmente no influye en el plegamiento de la proteína. También se usó serina para evitar sustancialmente una superficie especialmente hidrófoba.

25 Basándose en la información en los estudios de formación de mapas de epítopos, se combinaron las sustituciones seleccionadas entre los diferentes aminoácidos que destruían la unión de los Fvs humanos para el dominio III de HA22-LR. Las sustituciones se muestran en la Tabla 17 que sigue a continuación. LR05 tenía todas las sustituciones presentes en HA22-LR-8M y 4 sustituciones nuevas, LR06 tenía solamente 2 sustituciones de HA22-LR-8M y 4 sustituciones nuevas, y LO10 era similar a LR06 pero tenía una sustitución de 463A adicional (Tabla 17).

TABLA 17

LO5:	<u>406A, 432G, 467A, 490A, 513A, 548S, 590S, 592A,</u>	<u>427A, 505A, 538A, 458A</u>
	SUSTITUCIÓN DE 8 M	epítopo humano
LO6:	<u>467A, 490A,</u>	<u>427A, 505A, 538A, 458A</u>
	ser humano y ratones	epítopo de ser humano
LO10:	467A, 490A,	427A, 505A, 538A, 458A, 463A
LR-LO10R:	467A, 490A,	427A, 505A, 538A, 463A

30

TABLA 18

Proteína Sustituida	Resto sustituido en el dominio III													Rendimiento (mg)	Actividad (%)	
	406	427	432	458	463	467	490	505	513	538	548	590	592			
LR-8M	X		X			X	X		X		X	X	X			100
LO5	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	3		16
LO6		X		X		X	X	X		X				4,3		41
LO10		X		X	X	X	X	X		X				3		60

Proteína Sustituida	Resto sustituido en el dominio III													Rendimiento (mg)	Actividad (%)	
	406	427	432	458	463	467	490	505	513	538	548	590	592			
LR-LO10R		X			X	X	X	X			X				5,8	141

Las proteínas sustituidas se expresaron y se purificaron. El análisis en gel de SDS mostraba que las proteínas sustituidas eran homogéneas en más de un 95 %. Las proteínas codificadas se analizaron a continuación para la actividad citotóxica en varias líneas de células positivas para CD22 y para antigenicidad en términos de su capacidad para unirse a anticuerpos presentes en el suero de pacientes que habían formado anticuerpos neutralizantes para inmunotoxinas que contenían PE38. Se analizaron 25 sueros de pacientes que habían recibido varias inmunotoxinas (LMB-9, SS1P y HA22) diferentes.

Los datos en la Tabla 19 muestran que las 3 inmunotoxinas nuevas eran activas en líneas de linfoma positivo para CD22 con una CI_{50} de aproximadamente 1 ng/ml, pero menos activas que HA22-LR. La más activa era HA22-LO10, que era un 60 % tan activa como HA22-LR en células Daudi, un 27 % tan activa en células Raji, y un 29 % tan activa en células CA46 cells. Estas inmunotoxinas nuevas eran específicas para CD22 y no tenían actividad en las células A431 que no expresaban CD22 (Tabla 19).

TABLA 19

	CI_{50} (ng/ml)			
	HA22-LR	HA22-LO5	HA22-LO6	HA22-LO10
Raji	0,41	3,74	2,23	1,5 (27 %)
CA46	0,11	2,08	0,53	0,38 (29 %)
Daudi	0,18	1,25	0,57	0,3 (60 %)
A431	> 100	> 100	> 100	> 100 (0 %)

La antigenicidad se define como la unión de inmunógenos a los anticuerpos preexistentes. Para evaluar la antigenicidad de las HA22-LO sustituidas con sueros de paciente humano, se realizaron experimentos de competición en los que se media la concentración de cada una de las inmunotoxinas sustituidas que reducían el nivel de anticuerpos que reaccionaban con HA22 en un 50 %. Los resultados de competición habitual con dos sueros de pacientes se muestran en las Figuras 11A y 11B. La Figura 11A muestra que la concentración de HA22, HA22-LR, HA22-LO5, HA22-LO6, HA22-LR-8M, y HA22-LO10 a la que la unión a PE38 se inhibía en un 50 % (CI_{50}) era 84,8, 38,1, 4580, 1440, 3610, > 396000 nM, respectivamente. La proporción de la unión (CI_{50}) de HA22 a HA22-LR, HA22-LO5, HA22-LO6, HA22-LR-8M, y HA22-LO10 era 223, 1,85, 5,89, 2,35, y < 0,0214 %, respectivamente. La Figura 11B muestra que la concentración de HA22, HA22-LR, HA22-LO5, HA22-LO6, HA22-LR-8M, y HA22-LO10 a la que la unión a PE38 se inhibía en un 50 % (CI_{50}) era 50,9, 67700, > 396000, > 396000, > 396000 nM, respectivamente. La proporción de la unión (CI_{50}) de HA22 a HA22-LR, HA22-LO5, HA22-LO6, HA22-LR-8M, y HA22-LO10 era 0,752, < 0,0129, < 0,0129, < 0,0129, y < 0,0129 %.

Se analizó el conjunto de los sueros de 32 pacientes que se trataron durante más de 10 años con PE38 que contiene las inmunotoxinas SS1P, HA22, y LMB9. Las proporciones de unión usando las inmunotoxinas sustituidas se muestran en la Tabla 20. Se encontró que la antigenicidad de HA22-LR-LO10 con sueros humanos era sustancialmente reducida en comparación con HA22, HA22-LR, y HA22-LR8M. La Figura 12 es un gráfico que muestra el porcentaje de unión de anticuerpos a HA22, HA22-LR-8M, HA22-LRLO10, o HA22-LR-LO10R en los sueros de pacientes tratados usando PE38. HA22-LR-LO10R es similar a HA22-LO10 excepto porque HA22-LR-LO10R carece de la sustitución de R458A que está presente en HA22-LO10 (Tablas 17 y 18). La Figura 12 muestra que veintitrés de treinta y dos pacientes demostraban unión (antigenicidad) que se reducía en más de 100 veces (100 - 10000 veces). Solamente en cuatro de los treinta y dos pacientes no se pudo detectar una disminución de la antigenicidad.

ES 2 635 416 T3

TABLA 20

Paciente	ITs	Dilución	Unión (%)			
			HA22	LR	LO10	LO10R
1	BL22	1192	100	1,2072	0,0118	0,0241
2	BL22	2057	100	372,4138	493,1507	3000,0000
3	BL22	1231	100	528,0992	358,9888	1228,8462
4	BL22	9485	100	202,3988	431,3099	2947,5983
5	BL22	4187	100	5,9797	0,0021	0,0031
6	BL22	1430	100	2,2597	0,0016	0,0033
7	BL22	6673	100	50,1718	0,0057	< 0,00147
8	SS1P	1698	100	< 0,00187	< 0,00187	< 0,00187
9	SS1P	26789	100	< 0,0289	< 0,0289'	< 0,0289
10	SS1P	3876	100	< 0,00686	< 0,00686	< 0,00686
11	HA22	962	100	< 0,00194	< 0,00194	< 0,00194
12	HA22	10127	100	0,0219	< 0,00120	< 0,00120
13	HA22	1093	100	0,4298	0,0056	< 0,00555
14	LMB9	38802	100	191,2500	0,0031	382,5000
15	SS1P	121598	100	0,0034	< 0,00274	0,0060
16	SS1P	379861	100	0,4770	< 0,00247	0,0047
17	SS1P	269987	100	0,0433	0,0019	0,0026
18	SS1P	63115	100	0,0040	< 0,00272	< 0,00272
19	SS1P	12938	100	< 0,0623	< 0,0623	< 0,0623
20	SS1P	132398	100	< 0,00583	< 0,00583	0,0093
21	SS1P	10634	100	< 0,00293	< 0,00293	< 0,00293
22	SS1P	17989	100	< 0,00893	< 0,00893	< 0,00893
23	SS1P	20184	100	< 0,0359	< 0,0359	< 0,0359
24	SS1P	29387	100	< 0,00185	< 0,00185	0,0019
25	SS1P	77031	100	< 0,00755	< 0,00755	< 0,00755
26	SS1P	131839	100	< 0,0133	< 0,0133	< 0,0133
27	SS1P	23165	100	30,4545	12,6415	26,5347
28	SS1P	1792	100	17,8081	113,0324	40,1708
29	SS1P	12443	100	< 0,00721	< 0,00721	< 0,00721
30	SS1P	12873	100	< 63,3	< 63,3	< 63,3

Paciente	ITs	Dilución	Unión (%)			
			HA22	LR	LO10	LO10R
31	SS1P	4793	100	100,0000	100,0000	100,0000
32	SS1P	443961	100	41,5094	9,1667	36,3208
Sueros menos reactivos (%)			100	59	75	72

Se debe interpretar que el uso de los términos "uno" y "un" y "el" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) cubre tanto la forma en singular como en plural, a menos que se indique de otro modo en el presente documento o el contexto lo contradiga claramente. Las expresiones "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se deben interpretar como términos de extremos abiertos (es decir, significan "que incluye, pero no se limita a",) a menos que se indique de otro modo. En el presente documento, la mención de intervalos de valores pretende simplemente servir como un método abreviado para hacer referencia de forma individual a cada valor separado que entra dentro del intervalo, a menos que se indique de otro modo en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si ya se hubiera mencionado de forma individual en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otro modo en el presente documento o de otro modo el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o expresiones a modo de ejemplo (por ejemplo, "tales como") proporcionados en el presente documento, pretende simplemente aclarar mejor la invención y no presenta una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique de otro modo. En la memoria descriptiva no se debería interpretar que ninguna expresión indica que cualquier elemento no reivindicado es esencial para la práctica de la invención. Las realizaciones preferentes de la presente invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para realizar la invención. Las variaciones de esas realizaciones preferentes pueden llegar a ser evidentes para las personas con una experiencia habitual en la materia después de la lectura de la descripción precedente. Los inventores esperan que los expertos en la materia usen tales variaciones cuando sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otra forma distinta a la que se describe de forma específica en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES

<120> EXOTOXINA A DE PSEUDOMONAS CON EPÍTOPOS DE LINFOCITOS T Y/O LINFOCITOS B MENOS INMUNOGÉNICOS

<130> 710339

<150> US 61/495.085
<151> 09-06-2011

<150> US 61/535.668
<151> 16-09-2011

<160> 203

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 613
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 1

ES 2 635 416 T3

Ala Glu Glu Ala Phe Asp Leu Trp Asn Glu Cys Ala Lys Ala Cys Val
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Lys Asp Gly Val Arg Ser Ser Arg Met Ser Val Asp Pro
 20 25 30

Ala Ile Ala Asp Thr Asn Gly Gln Gly Val Leu His Tyr Ser Met Val
 35 40 45

Leu Glu Gly Gly Asn Asp Ala Leu Lys Leu Ala Ile Asp Asn Ala Leu
 50 55 60

Ser Ile Thr Ser Asp Gly Leu Thr Ile Arg Leu Glu Gly Gly Val Glu
 65 70 75 80

Pro Asn Lys Pro Val Arg Tyr Ser Tyr Thr Arg Gln Ala Arg Gly Ser
 85 90 95

Trp Ser Leu Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly His Glu Lys Pro Ser Asn
 100 105 110

Ile Lys Val Phe Ile His Glu Leu Asn Ala Gly Asn Gln Leu Ser His
 115 120 125

Met Ser Pro Ile Tyr Thr Ile Glu Met Gly Asp Glu Leu Leu Ala Lys
 130 135 140

ES 2 635 416 T3

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
 145 150 155 160
 Met Gln Pro Thr Leu Ala Ile Ser His Ala Gly Val Ser Val Val Met
 165 170 175
 Ala Gln Thr Gln Pro Arg Arg Glu Lys Arg Trp Ser Glu Trp Ala Ser
 180 185 190
 Gly Lys Val Leu Cys Leu Leu Asp Pro Leu Asp Gly Val Tyr Asn Tyr
 195 200 205
 Leu Ala Gln Gln Arg Cys Asn Leu Asp Asp Thr Trp Glu Gly Lys Ile
 210 215 220
 Tyr Arg Val Leu Ala Gly Asn Pro Ala Lys His Asp Leu Asp Ile Lys
 225 230 235 240
 Pro Thr Val Ile Ser His Arg Leu His Phe Pro Glu Gly Gly Ser Leu
 245 250 255
 Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
 260 265 270
 Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly
 275 280 285
 Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser
 290 295 300
 Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
 305 310 315 320
 Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala
 325 330 335
 Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg
 340 345 350
 Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Ala Asp Val Val
 355 360 365
 Ser Leu Thr Cys Pro Val Ala Ala Gly Glu Cys Ala Gly Pro Ala Asp
 370 375 380
 Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe
 385 390 395 400

ES 2 635 416 T3

Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn
 405 410 415

Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
 420 425 430

Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala Gln
 435 440 445

Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala
 450 455 460

Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 465 470 475 480

Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
 485 490 495

Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 500 505 510

Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu
 515 520 525

Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly
 530 535 540

Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
 545 550 555 560

Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
 565 570 575

Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln
 580 585 590

Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro
 595 600 605

Arg Glu Asp Leu Lys
 610

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa en la posición 1 es Leu, Ala, Gly, Ser o Gln
 5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 es Leu, Ala, Gly, Ser o Gln
 10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 es Tyr, Ala, Gly, Ser o Gln
 15

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 es Leu, Ala, Gly, Ser o Gln
 20

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 es Arg, Ala, Gly, Ser o Glu
 25

<400> 2

Xaa Val Ala Xaa Xaa Xaa Ala Ala Xaa Leu Ser Trp
1 5 10

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 30

<400> 3
 35

Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp
1 5 10

<210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40

<220>
 <223> Sintética
 45

<220>
 <221> misc
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa en la posición 2 es cualquier aminoácido
 50

<220>
 <221> misc
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa en la posición 3 es Arg o Lys
 55

<400> 4

Arg Xaa Xaa Arg
1
 60

<210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 5
 10
Lys Asp Glu Leu
1
 <210> 6
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 15
 <400> 6
Arg Glu Asp Leu Lys
1 5
 20
 <210> 7
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 25
 <400> 7
Arg Glu Asp Leu
1
 30
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 35
 <400> 8
Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10
 40
 <210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Sintética
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (2)..(3)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 50
 <400> 9
Arg Xaa Xaa Arg
1
 55

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 10
 10
Arg Lys Lys Arg
1
 <210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Sintética
 20
 <400> 11
Arg Arg Arg Arg
1
 25
 <210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 12
Arg Lys Ala Arg
1
 35
 <210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Sintética
 45
 <400> 13
Ser Arg Val Ala Arg Ser
1 5
 50
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Sintética
 <400> 14

Thr Ser Ser Arg Lys Arg Arg Phe Trp
1 5

5 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 15

Ala Ser Arg Arg Lys Ala Arg Ser Trp
1 5

15 <210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética
 <400> 16

Arg Arg Val Lys Lys Arg Phe Trp
1 5

25 <210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética
 35 <400> 17

Arg Asn Val Val Arg Arg Asp Trp
1 5

40 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética
 <400> 18

Thr Arg Ala Val Arg Arg Arg Ser Trp
1 5

50 <210> 19
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sintética

<400> 19

Arg Gln Pro Arg
1

5 <210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 20

15 **Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp**
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

25 <400> 21

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
1 5

30 <210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Sintética

<400> 22

40 **His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln**
1 5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 23

50 **Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu**
1 5

<210> 24
<211> 11
55 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

 <400> 24
 5 **Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu**
 1 5 10

 <210> 25
 <211> 4
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 15
 <400> 25

 Arg Ser Lys Arg
 1
 20 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Sintética

 <400> 26

 Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp
 1 5
 30

 <210> 27
 <211> 8
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 40 <400> 27

 His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu
 1 5

 45 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 50 <400> 28

 Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
 1 5
 55

 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

5 <400> 29

His Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10

10 <210> 30
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintética

<400> 30

Arg His Arg Ser Lys Arg
1 5

20 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

25 <400> 31

Pro Glu Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys
1 5 10 15

30 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

35 <400> 32

Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu
1 5 10 15

40 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 33

Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe
1 5 10 15

50 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

55 <400> 34

Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His
1 5 10 15

ES 2 635 416 T3

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 5
 <400> 35

Ala Cys His Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro
1 5 10 15
 10
 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 15
 <400> 36

Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
1 5 10 15
 20
 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 25
 <400> 37

Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5 10 15
 30
 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 38

Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
1 5 10 15
 35
 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 40
 <400> 39

Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro
1 5 10 15
 45
 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 50
 <400> 40

Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg
1 5 10 15

ES 2 635 416 T3

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 5
 <400> 47

Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn
1 5 10 15
 10
 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 15
 <400> 48

Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala
1 5 10 15
 20
 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 25
 <400> 49

Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
 30
 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 35
 <400> 50

Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15
 40
 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 45
 <400> 51

Ile Arg Asn Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly
1 5 10 15
 50
 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 55
 <400> 52

Ala Leu Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile
1 5 10 15
 <210> 53
 <211> 15

ES 2 635 416 T3

<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

5 <400> 53

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

10 <210> 54
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 54

15 **Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln**
1 5 10 15

20 <210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 55

25 **Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu**
1 5 10 15

30 <210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 56

Glu Ala Ile Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr
1 5 10 15

35 <210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

40 <400> 57

Arg Glu Gln Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala
1 5 10 15

45 <210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 58

50 **Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser**
1 5 10 15

<210> 59
<211> 15

ES 2 635 416 T3

<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 59

5

Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe
1 5 10 15

<210> 60
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

10

<400> 60

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

15

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

20

<400> 61

Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly
1 5 10 15

25

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

30

<400> 62

Ala Glu Ser Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu
1 5 10 15

35

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

40

<400> 63

Glu Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala
1 5 10 15

45

<210> 64
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 64

50

Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Gly
1 5 10 15

55

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 635 416 T3

<400> 65

Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp
1 5 10 15

5 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 66

Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp
1 5 10 15

15 <210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 67

Ala Gly Ala Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu
1 5 10 15

25 <210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 68

Ala Asn Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn
1 5 10 15

30 <210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 69

Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr
1 5 10 15

40 <210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 70

Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu
1 5 10 15

50 <210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 635 416 T3

<400> 71

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

5 <210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 72

Glu Arg Asn Tyr Pro Thr Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly
1 5 10 15

15 <210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 73

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

25 <210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 74

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

35 <210> 75
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 75

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

40 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 76

Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp
1 5 10 15

50 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 635 416 T3

<400> 77

Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu

1 5 10 15

5

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

10

<400> 78

Phe Ser Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu

1 5 10 15

15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

20

<400> 79

Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His

1 5 10 15

25

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

30

<400> 80

Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu

1 5 10 15

35

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 81

Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg

1 5 10 15

40

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

45

<400> 82

Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val

1 5 10 15

50

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

55

ES 2 635 416 T3

<400> 83

Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly
1 5 10 15

5 <210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 84

Arg Gln Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly
1 5 10 15

15 <210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 85

Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
1 5 10 15

25 <210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 86

Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
1 5 10 15

30

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

35 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 87

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

40

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

45 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 88

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

50

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 635 416 T3

<400> 89

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

5 <210> 90
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 90

Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser
1 5 10 15

15 <210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 91

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

25 <210> 92
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

30 <400> 92

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

35 <210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

40 <400> 93

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

45 <210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

50 <400> 94

Ala Arg Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile
1 5 10 15

55 <210> 95
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 635 416 T3

<400> 95

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

5 <210> 96
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 96

Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu
1 5 10 15

15 <210> 97
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 97

Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
1 5 10 15

25 <210> 98
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 98

Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln
1 5 10 15

30 <210> 99
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 99

Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu
1 5 10 15

40 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 100

Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala
1 5 10 15

50 <210> 101
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

55 <400> 101

ES 2 635 416 T3

Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg
1 5 10 15

5 <210> 102
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 102

Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn
1 5 10 15

10 <210> 103
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 103

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

20 <210> 104
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 104

Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val
1 5 10 15

30 <210> 105
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 35 <400> 105

Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro
1 5 10 15

40 <210> 106
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 45 <400> 106

Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser
1 5 10 15

50 <210> 107
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 107

ES 2 635 416 T3

Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly
 1 5 10 15

5 <210> 108
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 108

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

10 <210> 109
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 109

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

20 <210> 110
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 110

Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala
 1 5 10 15

30 <210> 111
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 35 <400> 111

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

40 <210> 112
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 45 <400> 112

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

50 <210> 113
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 635 416 T3

<400> 113

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

5 <210> 114
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 114

Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile
1 5 10 15

15 <210> 115
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 115

Ala Pro Glu Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro
1 5 10 15

25 <210> 116
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 116

Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu
1 5 10 15

35 <210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 117

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

40 <210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 118

Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr
1 5 10 15

50 <210> 119
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

55

ES 2 635 416 T3

<400> 119

Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu
1 5 10 15

5 <210> 120
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 120

Leu Pro Leu Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly
1 5 10 15

15 <210> 121
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 121

Arg Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu
1 5 10 15

25 <210> 122
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 122

Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile
1 5 10 15

30 <210> 123
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 123

Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp
1 5 10 15

40 <210> 124
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 124

Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala
1 5 10 15

50 <210> 125
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

55

ES 2 635 416 T3

<400> 125

Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr
1 5 10 15

5 <210> 126

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 126

Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
1 5 10 15

15 <210> 127

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 127

Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
1 5 10 15

25 <210> 128

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 128

Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr
1 5 10 15

30 <210> 129

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

35 <400> 129

Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
1 5 10 15

40 <210> 130

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 130

Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly
1 5 10 15

50 <210> 131

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 635 416 T3

<400> 131

Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu
1 5 10 15

5 <210> 132
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 132

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

15 <210> 133
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 133

Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
1 5 10 15

25 <210> 134
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 134

30 **Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu**
1 5 10 15

35 <210> 135
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 135

Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile
1 5 10 15

40 <210> 136
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 136

Asp Pro Ser Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu
1 5 10 15

50 <210> 137
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 635 416 T3

<400> 137

Ser Ile Pro Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr
1 5 10 15

5 <210> 138
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 138

Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln
1 5 10 15

15 <210> 139
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20 <400> 139

Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys
1 5 10 15

25 <210> 140
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 140

30 **Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg**
1 5 10 15

35 <210> 141
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 141

40 **Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu**
1 5 10 15

45 <210> 142
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa en la posición 12 es Ala, Gly, Ser, Gln o Asp

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (38)..(38)

ES 2 635 416 T3

<223> Xaa en la posición 38 es Ala, Gly, Ser, Gln o Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (73)..(73)
<223> Xaa en la posición 73 es Ala, Gly, Ser, Gln o Arg

<220>
10 <221> MISC_FEATURE
<222> (96)..(96)
<223> Xaa en la posición 96 es Ala, Gly, Ser, Gln o Arg

<220>
15 <221> MISC_FEATURE
<222> (119)..(119)
<223> Xaa en la posición 119 es Ala, Gly, Ser, Gln o Arg

<220>
20 <221> MISC_FEATURE
<222> (154)..(154)
<223> Xaa en la posición 154 es Ala, Gly, Ser, Gln o Glu

<220>
25 <221> MISC_FEATURE
<222> (196)..(196)
<223> Xaa en la posición 196 es Ala, Gly, Ser, Gln o Lys

<220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (198)..(198)
<223> Xaa en la posición 198 es Ala, Gly, Ser o Gln

<400> 142

ES 2 635 416 T3

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

Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His
 20 25 30

Arg Gln Leu Glu Glu Xaa Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr
 35 40 45

Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg
 50 55 60

Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Xaa Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Xaa
 85 90 95

Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser
 100 105 110

Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Xaa Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu
 115 120 125

Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg
 130 135 140

Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Xaa Gly Gly Arg Leu Glu Thr
 145 150 155 160

Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
 165 170 175

Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser
 180 185 190

Ile Pro Asp Xaa Glu Xaa Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser
 195 200 205

Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 210 215

<210> 143
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

5

ES 2 635 416 T3

<400> 143

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

Thr Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His
20 25 30

Arg Gln Leu Glu Glu Gly Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr
35 40 45

Phe Leu Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg
50 55 60

Ser Gln Asp Leu Asp Ala Ile Trp Ala Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp
65 70 75 80

Pro Ala Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Ala
85 90 95

Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser
100 105 110

Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Ala Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu
115 120 125

Ala Ala Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg
130 135 140

Leu Asp Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Glu Thr
145 150 155 160

Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala
165 170 175

Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser
180 185 190

Ile Pro Asp Ser Glu Ala Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser
195 200 205

Gln Pro Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
210 215

5

<210> 144

<211> 345

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 635 416 T3

<220>
<223> Sintética

5 <400> 144

Gly Gly Ser Leu Ala Ala Leu Thr Ala His Gln Ala Cys His Leu Pro
1 5 10 15

Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
20 25 30

Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala
35 40 45

Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val Ile Arg Asn Ala Leu
50 55 60

Ala Ser Pro Gly Ser Gly Gly Asp Leu Gly Glu Ala Ile Arg Glu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Gln Ala Arg Leu Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Glu Ser Glu
85 90 95

Arg Phe Val Arg Gln Gly Thr Gly Asn Asp Glu Ala Gly Ala Ala Asn
100 105 110

Gly Pro Ala Asp Ser Gly Asp Ala Leu Leu Glu Arg Asn Tyr Pro Thr
115 120 125

Gly Ala Glu Phe Leu Gly Asp Gly Gly Asp Val Ser Phe Ser Thr Arg
130 135 140

Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln
145 150 155 160

Leu Glu Glu Arg Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu
165 170 175

Glu Ala Ala Gln Ser Ile Val Phe Gly Gly Val Arg Ala Arg Ser Gln
180 185 190

Asp Leu Asp Ala Ile Trp Arg Gly Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala
195 200 205

Leu Ala Tyr Gly Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg
210 215 220

ES 2 635 416 T3

Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
 225 230 235 240

Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu Ala Ala
 245 250 255

Gly Glu Val Glu Arg Leu Ile Gly His Pro Leu Pro Leu Arg Leu Asp
 260 265 270

Ala Ile Thr Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu
 275 280 285

Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro
 290 295 300

Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
 305 310 315 320

Asp Lys Glu Gln Ala Ile Ser Ala Leu Pro Asp Tyr Ala Ser Gln Pro
 325 330 335

Gly Lys Pro Pro Arg Glu Asp Leu Lys
 340 345

5 <210> 145
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Sintética
 <400> 145

Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Ala Leu Ser Trp Asn Gln Val
 1 5 10 15

15 <210> 146
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sintética
 <400> 146

25 gtccaccttg gtgttgctgg gctt 24

25 <210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Sintética

	<400> 147 agactctccc ctggtgaagc tctt	24
5	<210> 148 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 148 caggtgcagc tgggtcagtc tgg	23
15	<210> 149 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
	<400> 149 caggtcaact taagggagtc tgg	23
25	<210> 150 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintética	
	<400> 150 gaggtgcagc tgggtggagtc tgg	23
35	<210> 151 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Sintética	
	<400> 151 caggtgcagc tgcaggagtc ggg	23
45	<210> 152 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
	<400> 152 gaggtgcagc tgttcagtc tgc	23
55	<210> 153 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

	<223> Sintética	
	<400> 153	
	caggtacagc tgcagcagtc agg	23
5	<210> 154	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 154	
	gacatccaga tgacccagtc tcc	23
15	<210> 155	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 155	
	gatgttgtga tgactcagtc tcc	23
25	<210> 156	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 156	
	gaaattgtgt tgacgcagtc tcc	23
35	<210> 157	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 157	
	gacatcgtga tgacccagtc tcc	23
45	<210> 158	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Sintética	
	<400> 158	
	gaaacgacac tcacgcagtc tcc	23
55	<210> 159	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60		

	<220> <223> Sintética	
5	<400> 159 gaaattgtgc tgactcagtc tcc	23
	<210> 160 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10		
	<220> <223> Sintética	
15	<400> 160 gccagccgg ccatggcca ggtgcagctg gtgcagtctg g	41
	<210> 161 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20		
	<220> <223> Sintética	
25	<400> 161 gccagccgg ccatggcca ggtcaacta agggagtctg g	41
	<210> 162 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30		
	<220> <223> Sintética	
35	<400> 162 gccagccgg ccatggccga ggtgcagctg gtggagtctg g	41
	<210> 163 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40		
	<220> <223> Sintética	
45	<400> 163 cccagccggc catggccag gtgcagctgc aggagtcggg	40
	<210> 164 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50		
	<220> <223> Sintética	
55	<400> 164 gccagccgg ccatggccga ggtgcagctg ttgcagtctg c	41
	<210> 165 <211> 41	
60		

ES 2 635 416 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Sintética

 <400> 165
gccacagcgg ccattggcca ggtacagctg cagcagtcag g **41**

10 <210> 166
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Sintética

 <400> 166
acctccagat ccgccaccac cggatccgcc tccgcctgag gagacggtga ccagggtgcc **60**

20 <210> 167
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Sintética

 <400> 167
acctccagat ccgccaccac cggatccgcc tccgcctgaa gagacggtga ccattgtccc **60**

30 <210> 168
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sintética

 <400> 168
acctccagat ccgccaccac cggatccgcc tccgcctgag gagacggtga ccagggttcc **60**

40 <210> 169
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Sintética

 <400> 169
acctccagat ccgccaccac cggatccgcc tccgcctgag gagacggtga ccgtggtccc **60**

50 <210> 170
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Sintética

 <400> 170
ggatccgggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaca tccagatgac ccagtctcc **59**

60 <210> 171

65 <210> 171

ES 2 635 416 T3

<211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Sintética

<400> 171
ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgatg ttgtgatgac tcagtctcc 59

10

<210> 172
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Sintética

<400> 172
ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaaa ttgtggtgac gcagtctcc 59

20

<210> 173
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Sintética

<400> 173
ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaca tcgtgatgac ccagtctcc 59

30

<210> 174
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Sintética

<400> 174
ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaaa cgacactcac gcagtctcc 59

40

<210> 175
 <211> 59
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Sintética

<400> 175
ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaaa ttgtgctgac tcagtctcc 59

50

<210> 176
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Sintética

<400> 176
gagtcattct cgacttgcgg ccgcacgttt gatttcacc ttggtccc 48

60

ES 2 635 416 T3

<210> 177
 <211> 48
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

 10 <400> 177
gagtcattct cgacttgagg cgcacggtt gatctccagc ttggtccc 48

 <210> 178
 <211> 48
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 20
 <400> 178
gagtcattct cgacttgagg cgcacggtt gatctccact ttggtccc 48

 <210> 179
 <211> 48
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 30
 <400> 179
gagtcattct cgacttgagg cgcacggtt gatctccacc ttggtccc 48

 <210> 180
 <211> 48
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética
 40
 <400> 180
gagtcattct cgacttgagg cgcacggtt aatctccagt cgtgtccc 48
 45
 <210> 181
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sintética

 <400> 181
gcttccgcca cctccagatc cgcaccacc ggatccgct ccgcc 45
 55
 <210> 182
 <211> 45
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sintética

	<400> 182 ggcggaggcg gatccggtgg tggcggatct ggaggtggcg gaagc	45
5	<210> 183 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintética	
	<400> 183 gtcctcgcaa ctgcggccca gccggccatg gcc	33
15	<210> 184 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 184 gagtcattct cgacttgcgg ccgc	24
30	<210> 185 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintética	
35	<400> 185 gccagccgg ccatggcc	18
40	<210> 186 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintética	
45	<400> 186 acctcagat ccgccaccac cggatccgcc tccgcc	36
50	<210> 187 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintética	
55	<400> 187 ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagc	36
60	<210> 188 <211> 30 <212> PRT <213> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	<400> 188	

ES 2 635 416 T3

Glu Gln Leu Glu Gln Cys Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu
 1 5 10 15

Tyr Leu Ala Ala Arg Leu Ser Trp Asn Gln Val Asp Gln Val
 20 25 30

5 <210> 189
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 189

Tyr Ala Gln Asp Gln Glu Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Tyr
 20 25 30

Arg Thr Ser Leu Thr Leu Ala Ala Pro Glu
 35 40

15 <210> 190
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 190

20 Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro
 1 5 10

25 <210> 191
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 191

30 Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu Pro Gly
 1 5 10

35 <210> 192
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 192

40 Phe Tyr Ile Ala Gly Asp Pro Ala Leu Ala Tyr Gly
 1 5 10

45 <210> 193
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 193

Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
1 5 10

5 <210> 194
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 194

Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp
1 5 10

10 <210> 195
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 195

Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala
1 5 10

20 <210> 196
 <211> 12
 <212> PRT
 25 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 196

Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Phe Leu Glu Ala Ala
1 5 10

30 <210> 197
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 35 <400> 197

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

40 <210> 198
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 45 <400> 198

Gly Pro Glu Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro
1 5 10 15

Leu Ala

50 <210> 199
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 199

ES 2 635 416 T3

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

Phe Gly

5 <210> 200
<211> 12
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 200

10 **Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys**
1 5 10

15 <210> 201
<211> 18
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 201

Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr Val Pro Arg Ser Ser Leu
1 5 10 15

Pro Gly

20 <210> 202
<211> 14
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
25 <400> 202

Glu Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu
1 5 10

30 <210> 203
<211> 18
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
35 <400> 203

Pro Asp Ala Arg Gly Arg Ile Arg Asn Gly Ala Leu Leu Arg Val Tyr
1 5 10 15

Val Pro

REIVINDICACIONES

1. Una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299 y R302, con la condición de que cuando la secuencia de aminoácidos comprenda una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R302, al menos uno de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298 y L299 está sustituido, en la que los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299 y R302 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1, y en la que la PE presenta un aumento de la actividad citotóxica y la PE presenta una reducción de la inmunogenicidad en comparación con una PE no sustituida, opcionalmente con una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 y/o una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T dentro de los restos de los aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556 y W558 de SEQ ID NO: 1, preferentemente en la que la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299 y R302 es una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos L294, L297, Y298, L299 y R302.
2. La PE de la reivindicación 1 que comprende $X_1VAX_2X_3X_4AAX_5LSW$ (SEQ ID NO: 2), en la que X_1 , X_2 y X_4 son independientemente leucina, alanina, glicina, serina o glutamina; X_3 es tirosina, alanina, glicina, serina o glutamina; y X_5 es arginina, alanina, glicina, serina o glutamina; con la condición de que la PE no comprenda LVALYLAARLSW (SEQ ID NO: 3) y que cuando X_5 es alanina, al menos uno de X_1 , X_2 , X_3 y X_4 es alanina, glicina, serina o glutamina.
3. La PE de la reivindicación 1 o 2, en las que la PE tiene una sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1.
4. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en las que la PE tiene una sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1, y la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos E282, E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331, Q332, D403, D406, R412, R427, E431, R432, R458, D461, D463, R467, Y481, R490, R505, R513, L516, E522, R538, E548, R551, R576, K590, Q592 y L597, en la que los restos de los aminoácidos E282, E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331, Q332, D403, D406, R412, R427, E431, R432, R458, D461, D463, R467, Y481, R490, R505, R513, L516, E522, R538, E548, R551, R576, K590, Q592 y L597 se definen por referencia a la SEQ ID NO: 1, preferentemente en la que la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B es una sustitución de, independientemente, alanina, glicina o serina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos R427, R458, D463, R467, R490, R505 y R538.
5. La PE de la reivindicación 4, en la que la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina, glicina o serina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos D406, R432, R467, R490, R513, E548, K590 y Q592.
6. La PE de la reivindicación 1 o 2, en las que la PE tiene una sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 y la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de valina, leucina o isoleucina en lugar del resto del aminoácido R490, en la que el resto del aminoácido R490 se define por referencia a la SEQ ID NO: 1, preferentemente en la que la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es:
- (a) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido D406;
 - (b) una sustitución de glicina para el resto del aminoácido R432;
 - (c) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R467;
 - (d) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R490;
 - (e) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido R513;
 - (f) una sustitución de serina para el resto del aminoácido E548;
 - (g) una sustitución de serina para el resto del aminoácido K590; y
 - (h) una sustitución de alanina para el resto del aminoácido Q592.
7. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en las que la PE tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 y la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, Y470, I471, A472, P475, A476, L477, I493, R494, N495, L498, L499, R500, V501, Y502, V503, R505, L508, P509, R551, L552, T554, I555, L556 y W558.

8. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en las que la PE tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 y la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos R427, F443, L477, R494, R505 y L552.
- 5
9. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en las que la PE tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 y la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de F443.
- 10
10. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en las que la PE tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 y la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de L552.
- 15
11. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en las que la PE tiene una sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 y la sustitución de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de F443 y L552.
- 20
12. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en las que la sustitución de uno o más de los restos de los aminoácidos en las posiciones R421, L422, L423, A425, R427, L429, Y439, H440, F443, L444, A446, A447, I450, 463-519, R551, L552, T554, I555, L556 y W558 de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de alanina, glicina, serina, o glutamina en lugar de uno o más de los restos de los aminoácidos I493, R494, N495, G496, L498, L499, R500, V501 e Y502.
- 25
13. Una molécula quimérica que comprende (a) un resto de direccionamiento conjugado o fusionado con (b) la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 30
14. La molécula quimérica de la reivindicación 13, en la que el resto de direccionamiento es un anticuerpo monoclonal, preferentemente en la que
- 35
- (a) el anticuerpo monoclonal se une de forma específica a un marcador de superficie celular seleccionado entre el grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y;
- (b) el resto de direccionamiento es un anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en B3, RFB4, SS, SS1, MN, MB, HN1, HN2, HB21, MORAb-009, HA22, y porciones de unión a antígeno de los mismos; y/o
- 40
- (c) el resto de direccionamiento es la porción de unión a antígeno de HA22.
15. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o la molécula quimérica de la reivindicación 13 o 14.
- 45
16. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 15.
17. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 16.
- 50
18. Una población de células aislada que comprende al menos una célula hospedadora de la reivindicación 17.
- 55
19. Una composición farmacéutica que comprende (a) la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, la molécula quimérica de la reivindicación 13 o 14, el ácido nucleico de la reivindicación 15, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 16, la célula hospedadora de la reivindicación 17, o la población de células de la reivindicación 18, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60
20. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, la molécula quimérica de la reivindicación 13 o 14, el ácido nucleico de la reivindicación 15, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 16, la célula hospedadora de la reivindicación 17, la población de células de la reivindicación 18, o la composición farmacéutica de la reivindicación 19, para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero.
- 65
21. Un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula diana, método que comprende poner en contacto la célula con la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, la molécula quimérica de la reivindicación 13 o 14, el ácido nucleico de la reivindicación 15, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 16, la célula hospedadora de la reivindicación 17, la población de células de la reivindicación 18, o la composición farmacéutica de la reivindicación 19, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de la célula diana, preferentemente en el que la célula diana
- (a) es una célula cancerosa; y/o
- (b) expresa un marcador de superficie celular seleccionado entre el grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y.

22. Un método para producir la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende (a) expresar de forma recombinante la PE y (b) purificar la PE.

5 23. Un método para producir la molécula quimérica de la reivindicación 13 o 14 que comprende (a) expresar de forma recombinante la molécula quimérica y (b) purificar la molécula quimérica.

24. Un método para producir la molécula quimérica de la reivindicación 13 o 14 que comprende (a) expresar de forma recombinante la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, (b) purificar la PE, y (c) unir de forma covalente un resto de direccionamiento a la PE purificada.

10

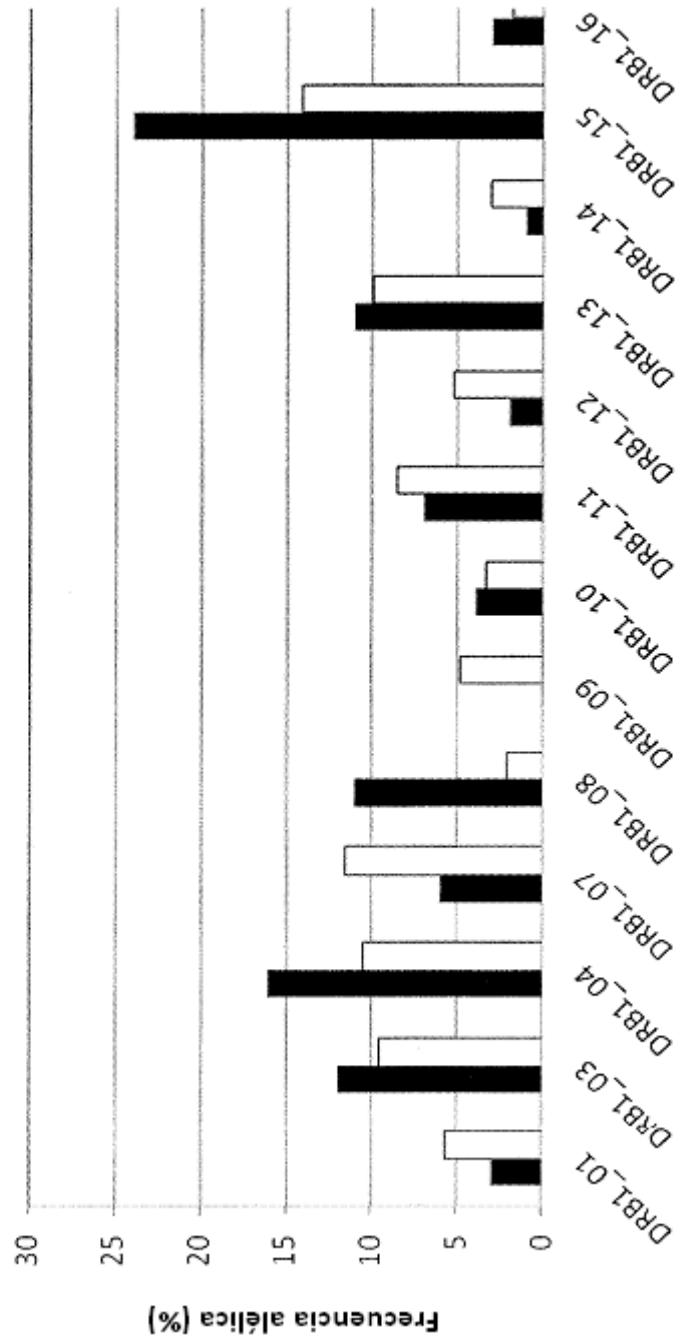


FIG. 1

Células Formadoras de Manchas por 1×10^6 células

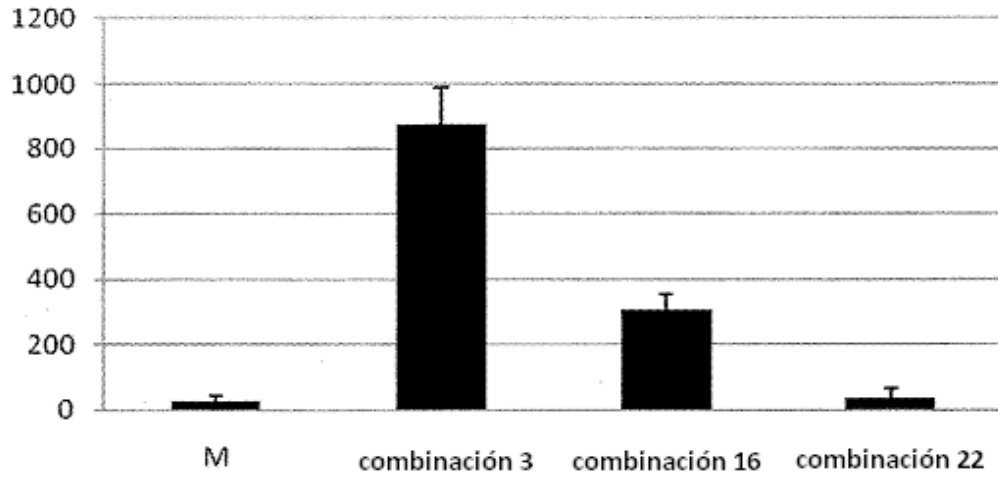


FIG. 2A

Células Formadoras de Manchas por 1×10^6 células

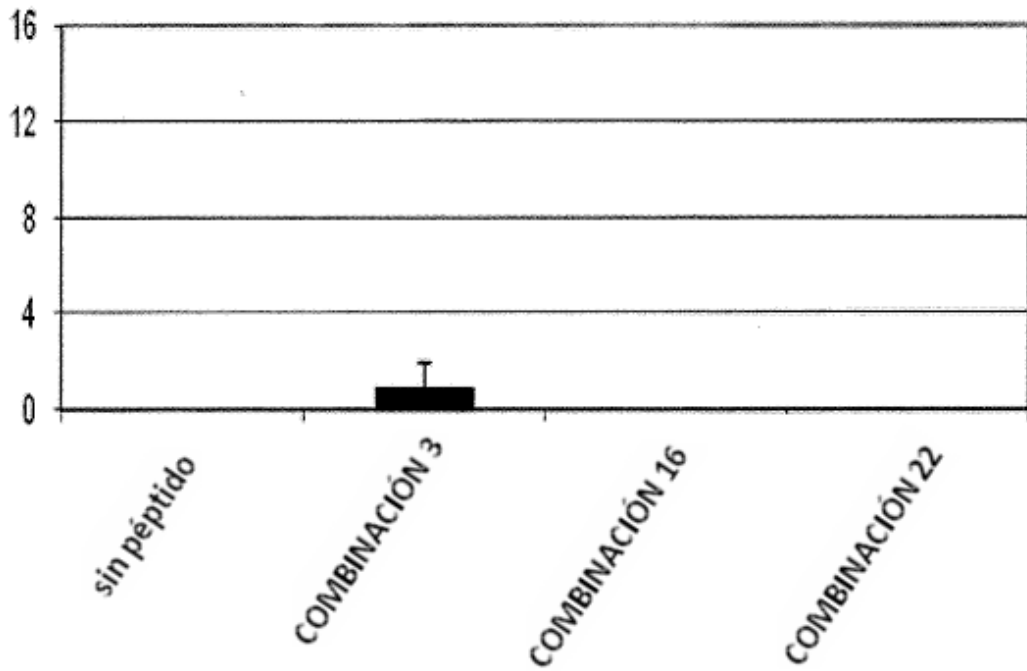


FIG. 2B

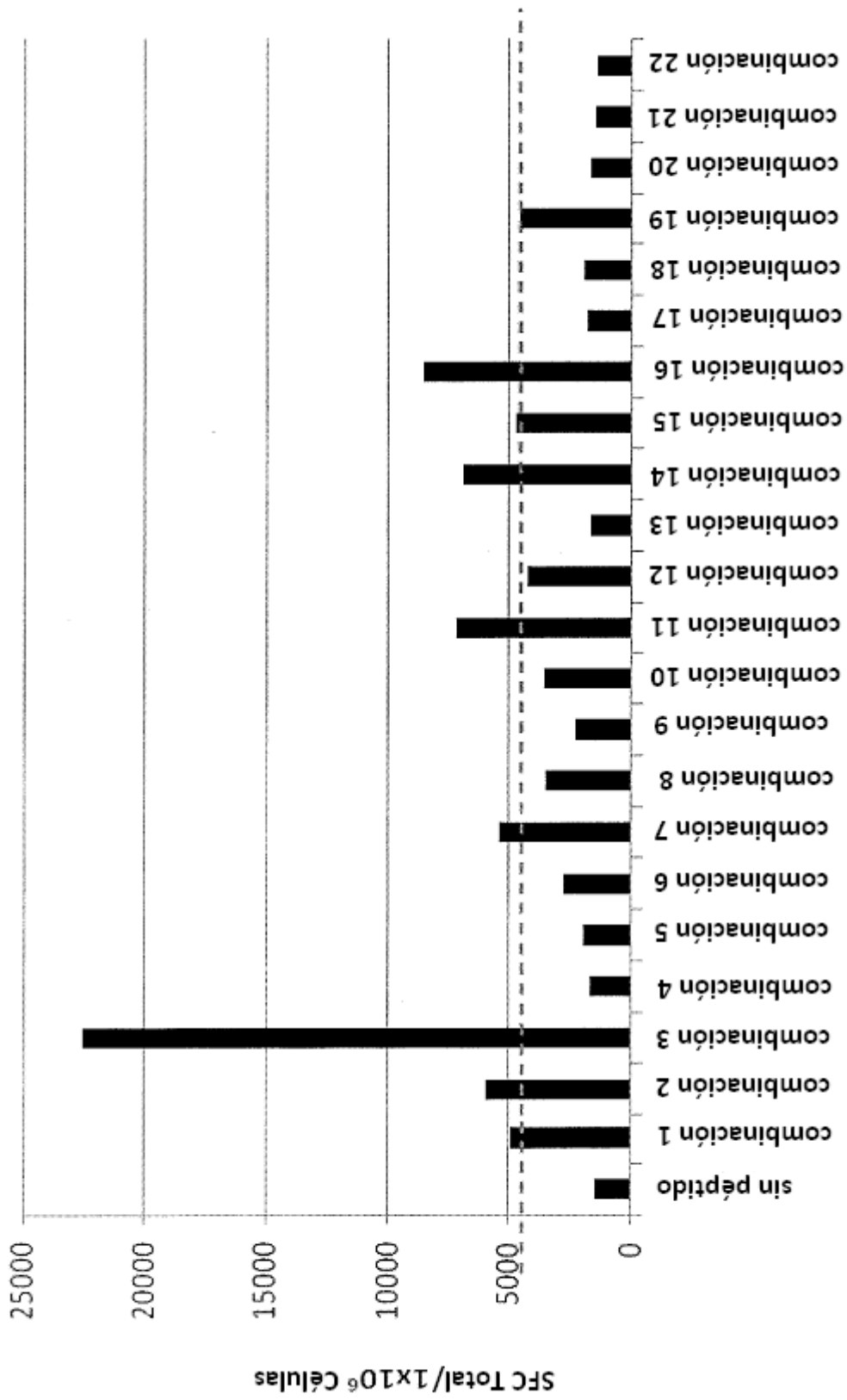


FIG. 3

SEQ. ID NO:	282	290	300	308	Intensidad de Respuesta (% de respuesta para la combinación 3)	SEQ ID NO. del área sombreada
188	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV		
donantes:	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV		
D010710aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	45
d021610aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	45
d031810aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	43
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	45
d033010aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	45
d040610aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	45
d040810aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	45
d120109aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	42
(nivel de respuesta bajo)	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	10%-50%	43
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	10%-50%	45
d122209aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	10%-50%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	45
d010510aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	44
(nivel de respuesta bajo)	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	45
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	10%-50%	45
d030410aphE	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	80%-100%	44
	E QLE QCG YP	V QRL VAL YLA	ARLSWNQV	DQV	50%-80%	45

FIG. 4

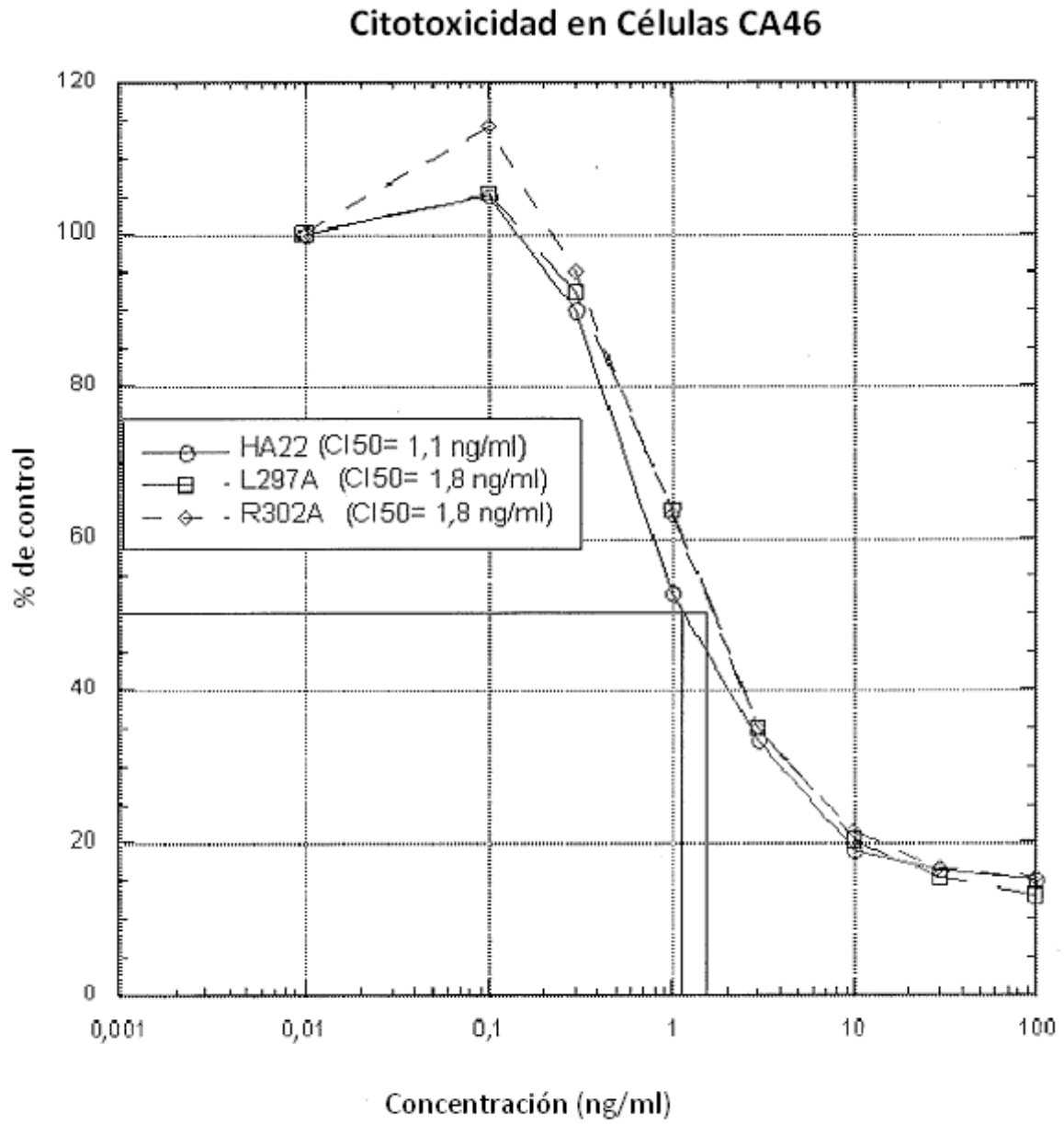


FIG. 5

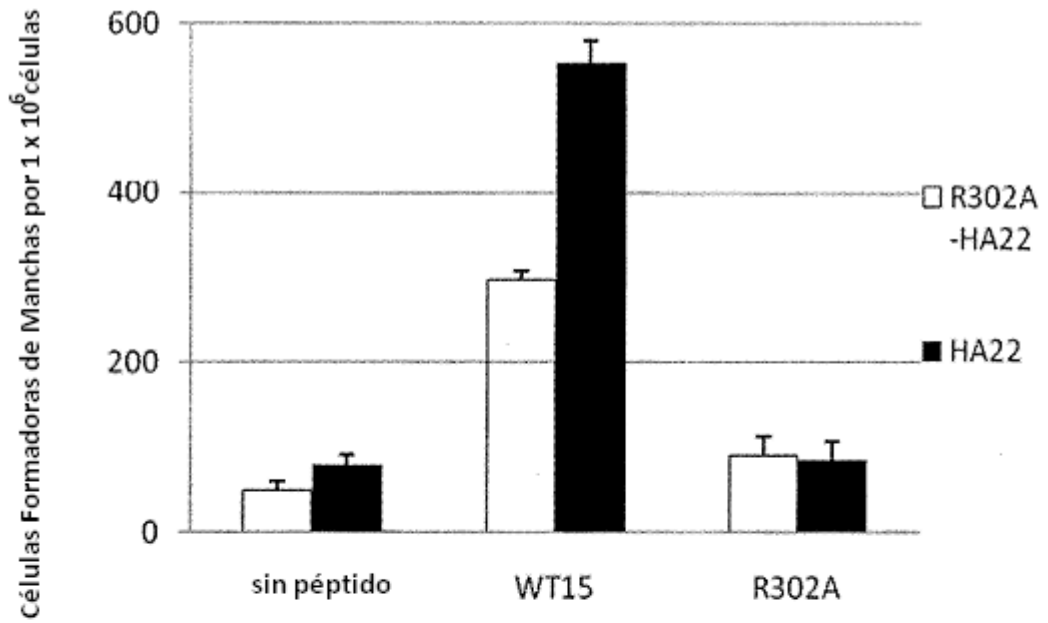


FIG. 6A

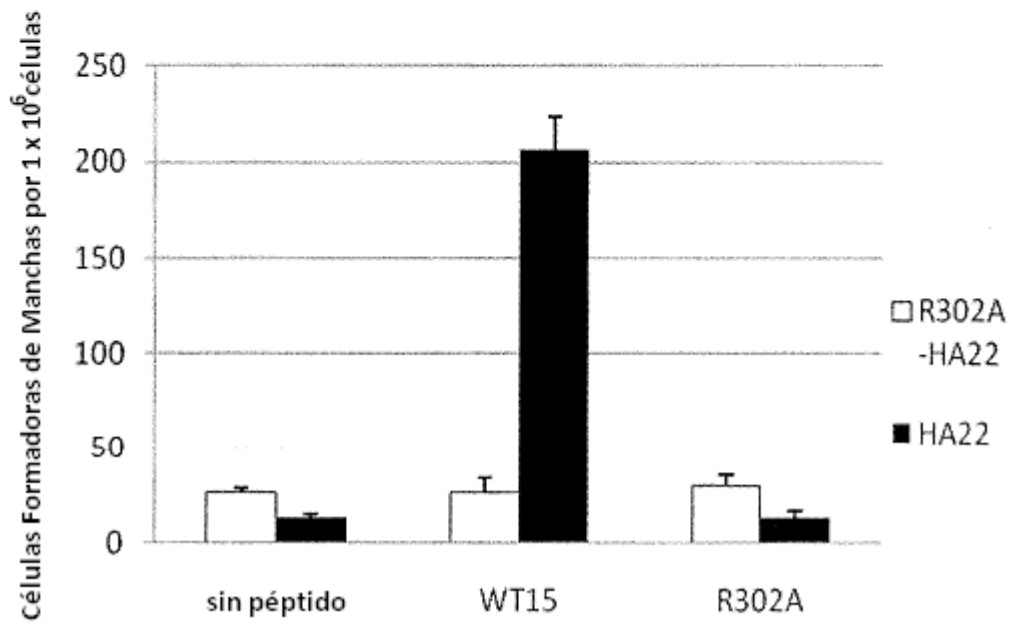


FIG. 6B

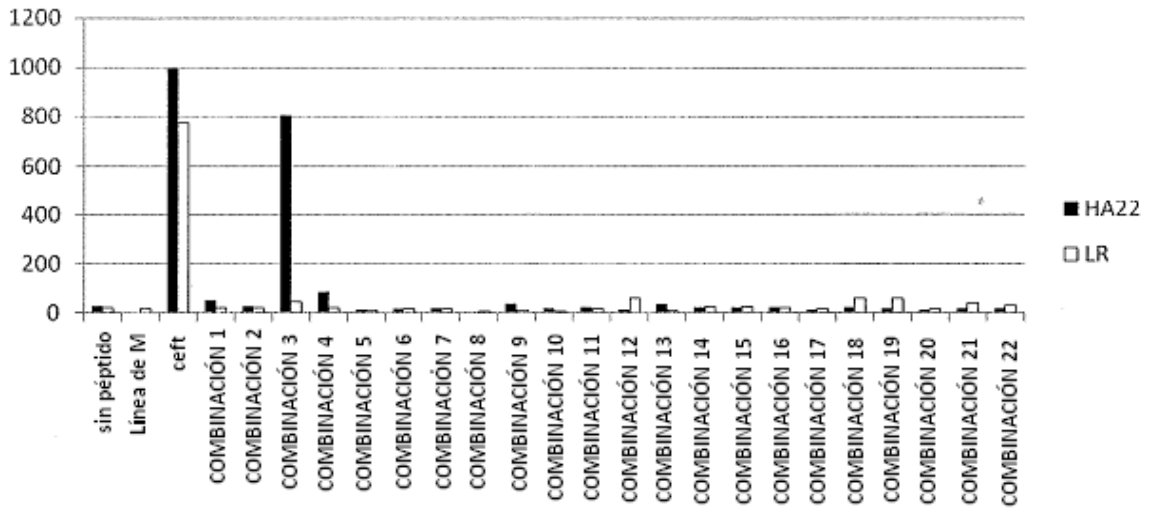


FIG. 7A

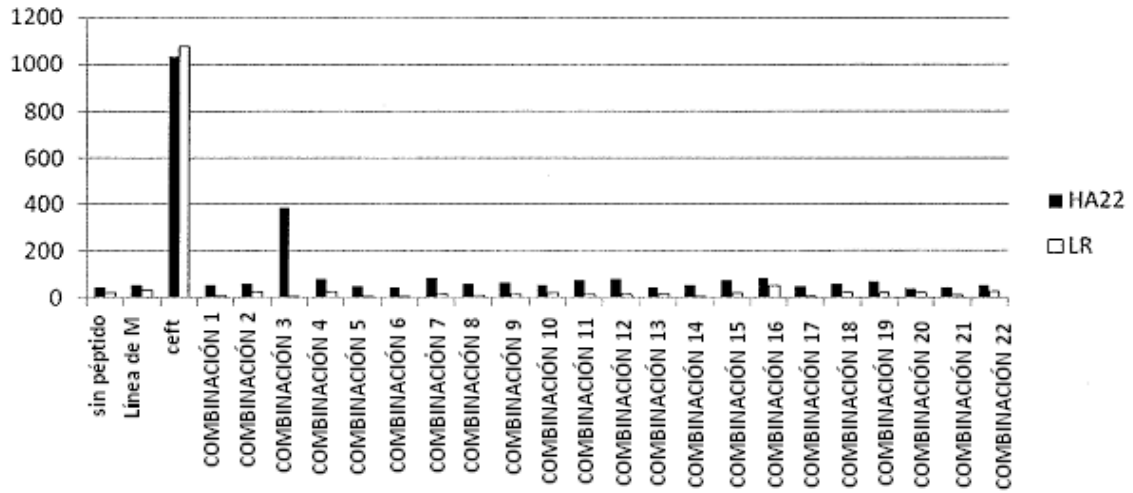


FIG. 7B

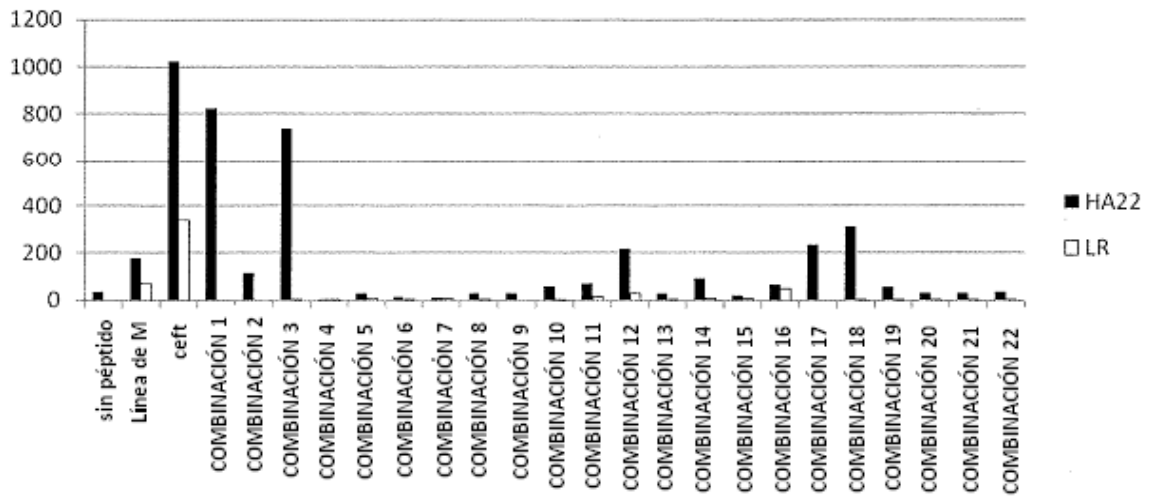


FIG. 7C

SEQ ID NO de SEQ ID NO: 189
Areas Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
Paciente Sombreada

1	102	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
2	107	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
3	105	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
4	106	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
5	103	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
6	104	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
7	203	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
8	107	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
9	108	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
10	107	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
11	104	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
12	106	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
13	107	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
14	105	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
15	107	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
16	108	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
17	105	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
18	104	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
19	106	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E
20	107	Y A Q D Q E P D A R G R I R N S A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E

FIG. 8

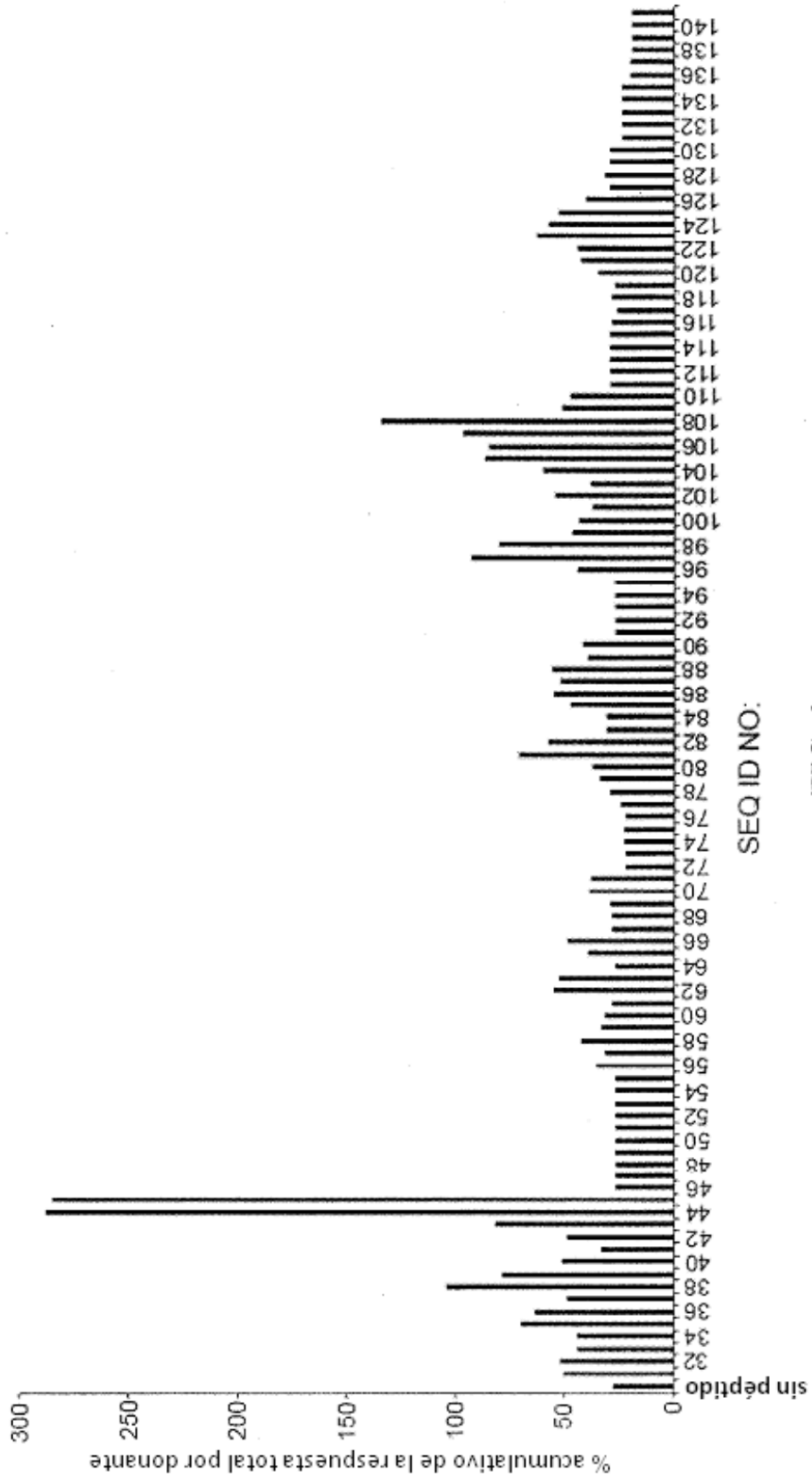


FIG. 9

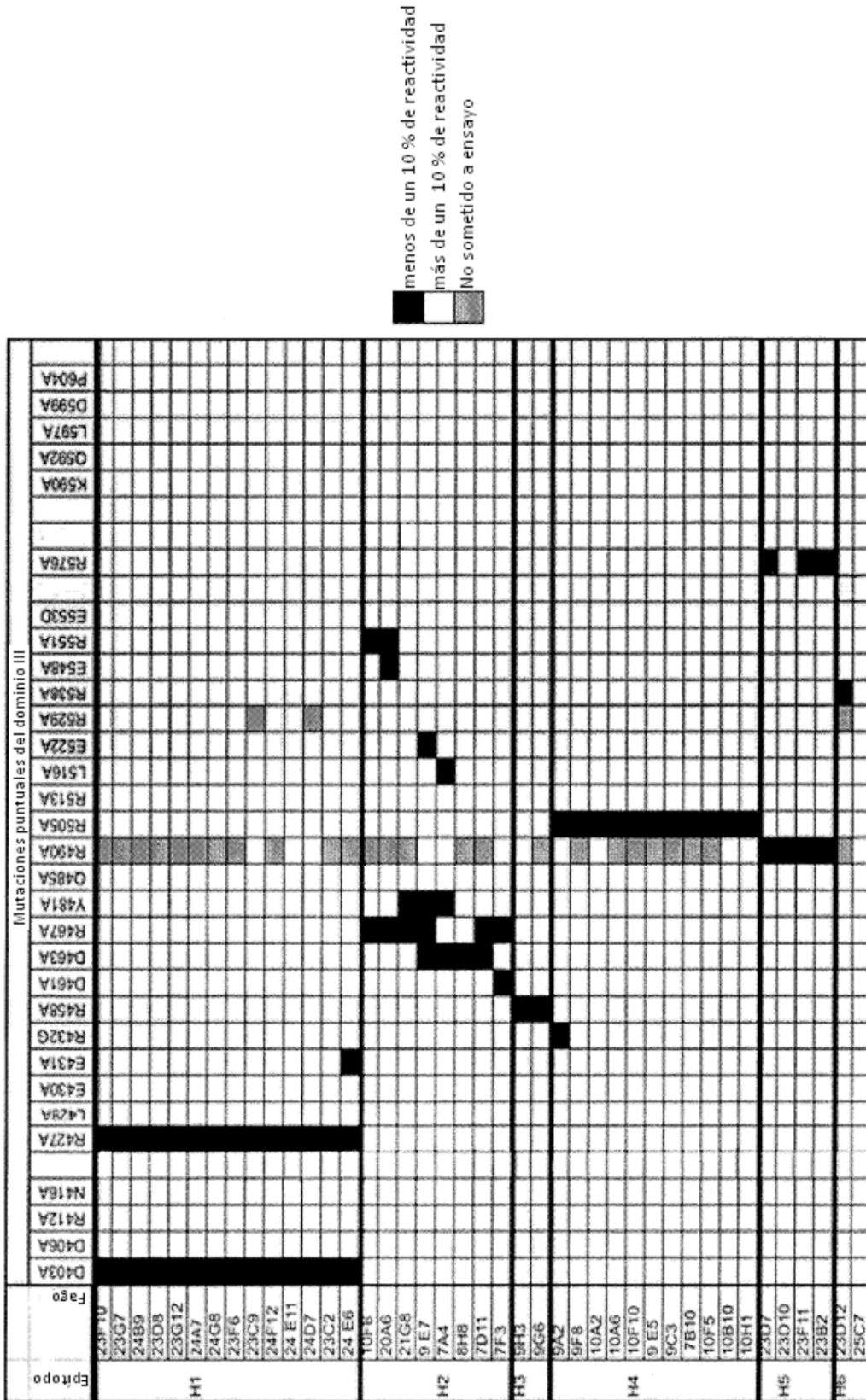


FIG. 10

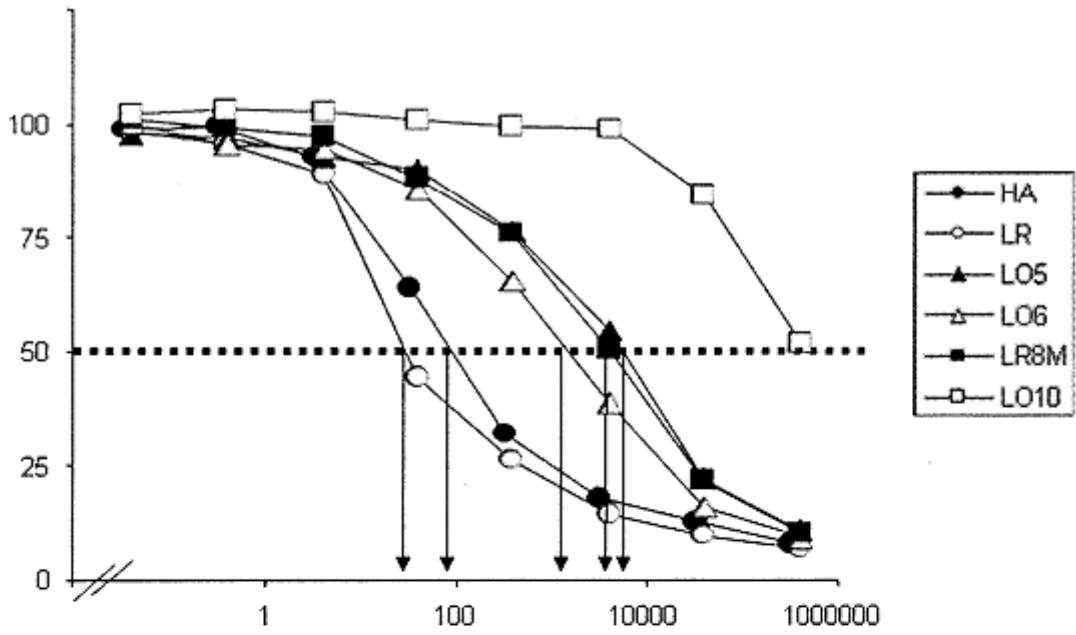


FIG. 11A

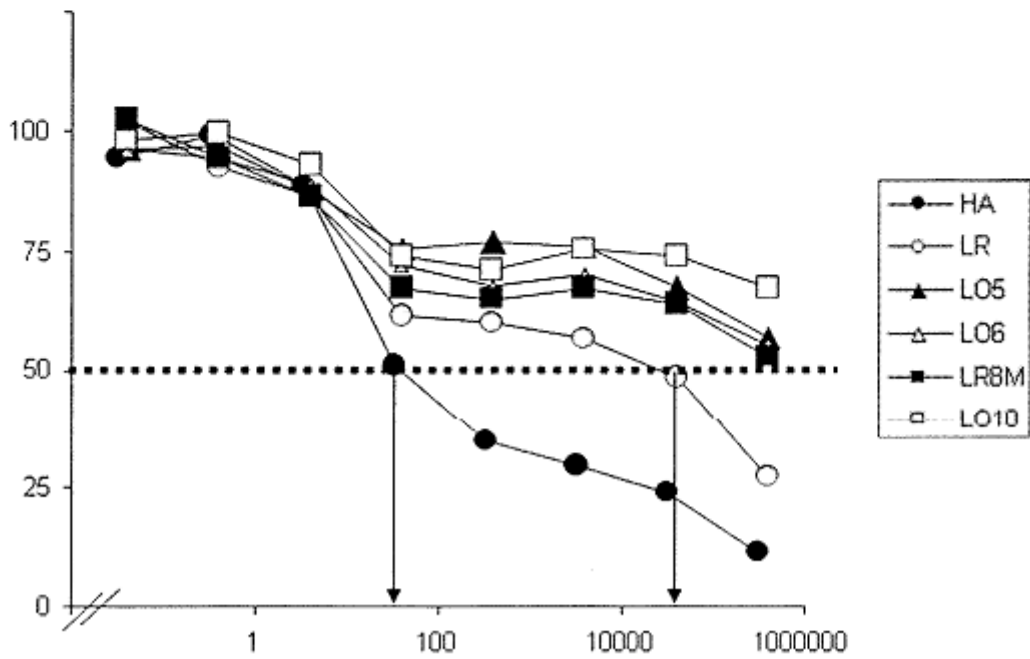


FIG. 11B

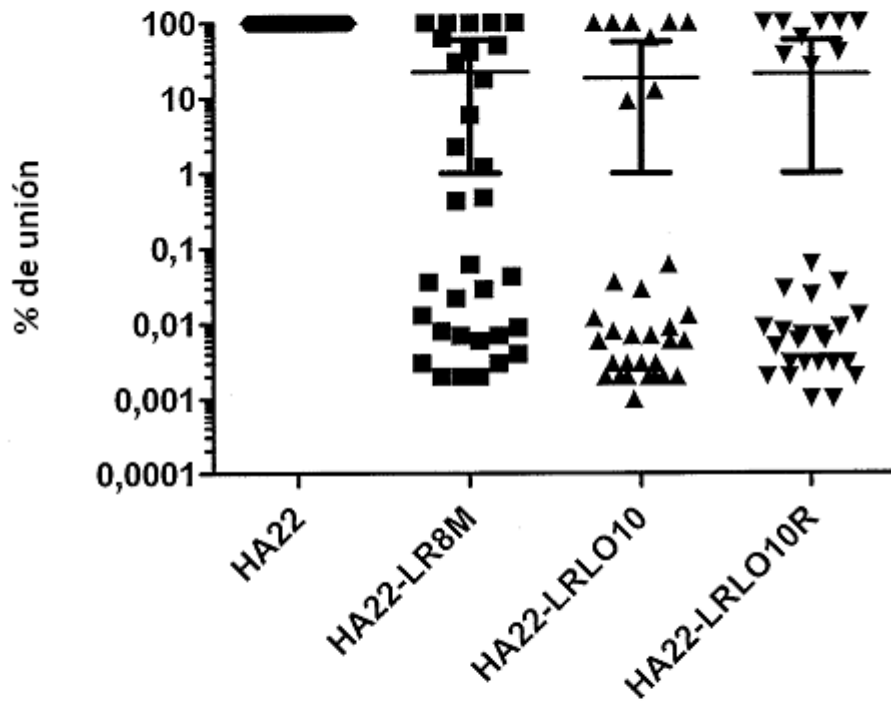


FIG. 12