

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 505**

51 Int. Cl.:

C07K 14/21 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
C07K 16/12 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.09.2012 PCT/US2012/055034**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13040141**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2012 E 12766780 (6)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2755993**

54 Título: **Exotoxina A de Pseudomonas con epítomos de linfocitos B menos inmunogénicos**

30 Prioridad:

16.09.2011 US 201161535668 P

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

27.02.2018

73 Titular/es:

**THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE
 SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
 HUMAN SERVICES (100.0%)
 National Institutes of Health Office of Technology
 Transfer 6011 Executive Boulevard, Suite 325
 MSC 7660
 Bethesda, MD 20892-7660, US**

72 Inventor/es:

PASTAN, IRA, H.;
ONDA, MASANORI y
LIU, WENHAI

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
 Bemerkungen) en el folleto original publicado por
 la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 656 505 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 B menos inmunogénicos

5 La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) es una toxina bacteriana con actividad citotóxica que puede ser eficaz en destruir o inhibir el crecimiento de células no deseables, por ejemplo, células cancerosas. Por consiguiente, PE puede ser útil para tratar o prevenir enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer. La entrada de la base de datos Geneseq que tiene el número de acceso AAU96810 muestra la secuencia de aminoácidos de la exotoxina PE40 de *Pseudomonas*. Se han caracterizado diferentes epítomos de linfocitos B asociados a una forma truncada de
10 exotoxina de *Pseudomonas* (PE38) (Onda, The Journal of Immunology, 2006, 177: 8822-8834). Además, se ha usado la localización y composición de aminoácidos de epítomos de linfocitos B en una porción de 25 kDa de exotoxina de *Pseudomonas* para producir una inmunotoxina que tiene actividad antitumoral en ratones (Onda, PNAS, 108: 5742-5747). Sin embargo, la PE puede ser altamente inmunogénica. Por consiguiente, la administración de PE puede estimular una respuesta inmunitaria anti-PE que incluye, por ejemplo, la producción de anticuerpos
15 anti-PE, linfocitos B y/o linfocitos T, que neutraliza no deseablemente la actividad citotóxica de PE. Tal inmunogenicidad puede reducir la cantidad de PE que puede ser administrada al paciente que puede, a su vez, reducir la eficacia de PE para tratar la enfermedad, por ejemplo, cáncer. Así, existe una necesidad de PE mejorada. La presente invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones.

20 Un aspecto de la invención se refiere a una PE que comprende una secuencia de aminoácidos de PE, en la que el resto de aminoácido D463, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1, está sustituido, en la que la PE tiene actividad citotóxica y es menos inmunogénica que PE sin sustituir, en la que

- 25 (i) la PE tiene sustituciones adicionales de los restos de aminoácidos R427, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1, o
(ii) la PE tiene sustituciones adicionales de los restos de aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.

30 La invención también se refiere a una PE que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula I:



en la que:

- 35 m, n y p son, independientemente, 0 o 1;
FCS comprende una secuencia de escisión por furina de restos de aminoácidos, secuencia que es escindible por furina;
R¹ comprende 1 a 10 restos de aminoácidos;
40 R² comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 285-364 de SEQ ID NO: 1;
R³ comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 365-394 de SEQ ID NO: 1; y
el dominio III funcional de PE comprende los restos 395-613 de SEQ ID NO: 1 que tienen una sustitución de resto de aminoácido D463 como se define por referencia a SEQ ID NO: 1,
en la que la PE tiene actividad citotóxica y es menos inmunogénica que PE sin sustituir,
45 en la que

- (i) la PE tiene sustituciones adicionales de los restos de aminoácidos R427, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1, o
50 (ii) la PE tiene sustituciones adicionales de los restos de aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula quimérica que comprende (a) un resto de direccionamiento conjugado o fusionado con (b) la PE de la invención, preferentemente en la que el resto de direccionamiento es cualquiera de:

- 55 (1) un anticuerpo monoclonal, preferentemente en el que el anticuerpo monoclonal se une específicamente a un marcador de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y, o
60 (2) la porción de unión al antígeno de la inmunotoxina HA22.

La invención se refiere además a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la PE de la invención o la molécula quimérica de la invención. También está comprendido por la presente invención un vector de expresión recombinante que comprende dicho ácido nucleico. La invención también proporciona una célula hospedadora que comprende dicho vector de expresión recombinante. Otro aspecto de la presente invención se refiere a una población aislada de células que comprende al menos una célula hospedadora de la invención.
65

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) la PE de la invención, la molécula quimérica de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de expresión recombinante de la invención, la célula hospedadora de la invención, o la población de células de la invención, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. También está comprendida por la presente invención la PE de la invención, la molécula quimérica de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de expresión recombinante de la invención, la célula hospedadora de la invención, la población de células de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en inhibir el crecimiento de una célula diana, preferentemente en la que la célula diana:

- 5
- 10 (a) es una célula cancerosa, o
(b) expresa un marcador de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en CD 19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y.

15 La invención también se refiere a la PE de la invención, la molécula quimérica de la invención, el ácido nucleico de la invención, el vector de expresión recombinante de la invención, la célula hospedadora de la invención, la población de células de la invención, o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un mamífero.

20 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método de producción de una PE que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la PE de la invención para proporcionar la PE y (b) purificar la PE. La invención también se refiere a un método de producción de una molécula quimérica que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula quimérica de la invención para proporcionar la molécula quimérica y (b) purificar la molécula quimérica. También está comprendido por la presente invención un método de producción de una molécula quimérica que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la PE de la invención para proporcionar la PE, (b) purificar la PE, y (c) unir covalentemente un resto de direccionamiento a la PE purificada, preferentemente en el que el resto de direccionamiento es cualquiera de:

- 25
- 30 (1) un anticuerpo monoclonal, preferentemente en el que el anticuerpo monoclonal se une específicamente a un marcador de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en CD 19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y, o
(2) la porción de unión al antígeno de la inmunotoxina HA22.

35 Una realización de la divulgación proporciona una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) que comprende una secuencia de aminoácidos de PE que tienen una sustitución de, independientemente, uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 como se define por referencia a 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 aminoácidos E420, D463, Y481, R563, D581, D589 y K606 esté sustituido, en la que la PE tiene opcionalmente una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítopos de linfocitos T, una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítopos de linfocitos B, y/o una delección de uno o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 1-273 y 285-394 como se define por SEQ ID NO: 1.

40

45 Otra realización de la divulgación proporciona una PE que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula I:



50 en la que:

- m, n y p son, independientemente, 0 o 1;
FCS comprende una secuencia de escisión por furina de restos de aminoácidos, secuencia que es escindible por furina;
R¹ comprende 1 a 10 restos de aminoácidos;
55 R² comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 285-364 de SEQ ID NO: 1;
R³ comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 365-394 de SEQ ID NO: 1; y
el dominio III funcional de PE comprende los restos 395-613 de SEQ ID NO: 1 que tiene una sustitución de, independientemente, uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 como se define por referencia a 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 aminoácidos E420, D463, Y481, R563, D581, D589 y K606 esté sustituido,
60 en la que la PE tiene opcionalmente una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítopos de linfocitos T y/o una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítopos de linfocitos B.

65 Realizaciones adicionales de la divulgación proporcionan moléculas quiméricas relacionadas, además de ácidos

nucleicos relacionados, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, poblaciones de células y composiciones farmacéuticas.

5 Todavía otra realización de la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de cáncer en un mamífero que comprende administrar al mamífero la PE proporcionada en el presente documento, molécula quimérica, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula hospedadora, población de células, o composición farmacéutica, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

10 Otra realización de la divulgación proporciona un método de inhibición del crecimiento de una célula diana que comprende poner en contacto la célula con la PE proporcionada en el presente documento, molécula quimérica, ácido nucleico, vector de expresión recombinante, célula hospedadora, población de células, o composición farmacéutica, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de la célula diana.

15 Realizaciones adicionales de la divulgación proporcionan métodos de producción de la PE proporcionada en el presente documento y métodos de producción de la molécula quimérica proporcionada en el presente documento.

20 La Figura 1 es una gráfica que muestra la reactividad del fago anti-PE38 (dominio III) contra HA22 sustituido en un punto. Las celdas negras representan menos del 10 % de reactividad, las celdas blancas representan más del 10 % de reactividad y las células grises indican no probadas. Las sustituciones están ordenadas por su localización de extremo N (izquierda) a extremo C (derecha).

25 Las Figuras 2A y 2B son gráficos de líneas que muestran los resultados de experimentos de competición que prueban la concentración de cada una de las inmunotoxinas sustituidas HA22 ("HA", círculos rellenos), HA22-LR ("LR", círculos en blanco), HA22-LO5 ("LO5", triángulos rellenos), HA22-LO6 ("LO6", triángulos en blanco), HA22-LR-8M ("LR8M", cuadrados rellenos) y HA22-LO10 ("LO10", cuadrados en blanco) que redujeron el nivel de anticuerpos que reaccionaban con HA22 el 50 % (línea de puntos) en el suero de un primer (Figura 2A) y segundo (Figura 2B) paciente que se sometió a ensayos clínicos con HA22.

30 La Figura 3 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.

35 La exotoxina A de *Pseudomonas* ("PE") es una toxina bacteriana (peso molecular 66 kD) secretada por *Pseudomonas aeruginosa*. La secuencia de PE no mutada nativa (SEQ ID NO: 1) se expone en la patente de EE.UU. 5.602.095. La PE no mutada nativa incluye tres dominios estructurales que contribuyen a la citotoxicidad. El dominio I (aminoácidos 1-252) media en la unión a célula, el dominio II (aminoácidos 253-364) media en la translocación en el citosol, y el dominio III (aminoácidos 400-613) media en la ribosilación del ADP del factor de elongación 2. Aunque se considera que el límite estructural del dominio III de PE empieza en el resto 400, se contempla que el dominio III puede requerir un segmento de dominio Ib para retener la actividad de ribosilación del ADP. Por consiguiente, el dominio III funcional se define como los restos 395-613 de PE. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) sigue sin estar definida. Sin quedar ligado a teoría particular o mecanismo, se cree que la actividad citotóxica de PE se produce mediante la inhibición de la síntesis de proteínas en células eucariotas, por ejemplo, por la inactivación de la ribosilación del ADP del factor de elongación 2 (EF-2).

45 Las sustituciones de PE se definen en el presente documento por referencia a la secuencia de aminoácidos de PE. Así, sustituciones de PE se describen en el presente documento por referencia al resto de aminoácido presente en una posición particular, seguido del aminoácido con el que el resto se ha sustituido en la sustitución particular en discusión. A este respecto, las posiciones de la secuencia de aminoácidos de una realización particular de una PE se refieren en el presente documento como las posiciones de la secuencia de aminoácidos de la realización particular o como las posiciones como se define por SEQ ID NO: 1. Cuando las posiciones son como se definen por 50 SEQ ID NO: 1, entonces las posiciones actuales de la secuencia de aminoácidos de una realización particular de una PE se definen con respecto a las posiciones correspondientes de SEQ ID NO: 1 y pueden representar números de posición de restos diferentes a los números de posición de restos de SEQ ID NO: 1. Así, por ejemplo, sustituciones se refiere a una sustitución de un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de una realización particular de una PE correspondiente a la posición indicada de la secuencia de 613 aminoácidos de 55 SEQ ID NO: 1 con el entendimiento de que las posiciones actuales en las secuencias de aminoácidos respectivas pueden ser diferentes. Por ejemplo, cuando las posiciones son como se definen por SEQ ID NO: 1, el término "R490" se refiere a la arginina normalmente presente en la posición 490 de SEQ ID NO: 1, "R490A" indica que la arginina normalmente presente en la posición 490 de SEQ ID NO: 1 está sustituida por una alanina, mientras que "K590Q" indica que la lisina normalmente presente en la posición 590 de SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con 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 aminoácidos que se sustituyen puede estar sustituido con el mismo resto de aminoácido o diferente, a menos que se indique explícitamente de otro modo.

65 Los términos "exotoxina de *Pseudomonas*" y "PE", como se usan en el presente documento, incluyen PE que ha sido modificada a partir de la proteína nativa para reducir o para eliminar la inmunogenicidad. Tales modificaciones

- pueden incluir, pero no se limitan a, eliminación del dominio Ia, diversas deleciones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de un único aminoácido y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo tales como DEL y REDL (SEQ ID NO: 7). Véase Siegall et al., *J. Biol. Chem.*, 264: 14256-14261 (1989). Tales PE modificadas pueden ser adicionalmente modificadas para incluir cualquiera de la(s) sustitución (sustituciones) proporcionada(s) en el presente documento para uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B descritos en el presente documento. En una realización, la PE modificada puede ser un fragmento citotóxico de PE no mutada nativa. Fragmentos citotóxicos de PE pueden incluir aquellos que son citotóxicos con o sin procesamiento proteolítico posterior u otro procesamiento en la célula diana (por ejemplo, como una proteína o pre-proteína). En una realización preferida, el fragmento citotóxico de PE retiene al menos aproximadamente el 20 %, preferentemente al menos aproximadamente el 40 %, más preferentemente aproximadamente el 50 %, incluso más preferentemente el 75 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, y todavía más preferentemente el 95 % de la citotoxicidad de PE nativa. En realizaciones particularmente preferidas, el fragmento citotóxico tiene al menos la citotoxicidad de PE nativa, y preferentemente tiene elevada citotoxicidad en comparación con PE nativa.
- 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 la que PE38 tiene la secuencia QQR añadida en el extremo C), PE38KDEL (en la que PE38 tiene la secuencia KDEL (SEQ ID NO: 5) añadida en el extremo C), PE-LR (resistencia a degradación lisosómica) y PE35.
- En una realización, la PE se ha modificado para reducir la inmunogenicidad por deleción del dominio Ia como se describe en la patente de EE.UU. 4.892.827. La PE también puede modificarse sustituyendo ciertos restos del dominio Ia. En una realización, la PE puede ser PE4E, que es una PE sustituida en la que el dominio Ia está presente, pero en la que los restos básicos del dominio Ia en las posiciones 57, 246, 247 y 249 se sustituyen por restos ácidos (por ejemplo, ácido glutámico), como se desvela en la patente de EE.UU. 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 del extremo carboxilo de 35 kD de PE en el que los restos de aminoácidos 1-279 han sido deleccionados y la molécula comienza con una Met en la posición 280, seguido de los aminoácidos 281-364 y 381-613 de PE como se define por referencia a SEQ ID NO: 1. PE35 y PE40 se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 5.602.095 y 4.892.827. PE25 contiene el fragmento de 11 restos del dominio II y todo el dominio III. En algunas realizaciones, la PE contiene solo el dominio III.
- En una realización preferida, la PE es PE38. PE38 contiene los dominios de translocación y de ribosilación del ADP de PE, pero no la porción de unión a célula (Hwang J. et al., *Cell*, 48: 129-136 (1987)). PE38 (SEQ ID NO: 144) es una pro-proteína de PE truncada compuesta de los aminoácidos 253-364 y 381-613 de SEQ ID NO: 1 que se activa a su forma citotóxica tras el procesamiento dentro de una célula (véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.608.039, y Pastan et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1333: C1-C6 (1997)).
- En otra realización preferida, la PE es PE-LR. PE-LR contiene una deleción del dominio II, excepto por una secuencia de escisión por furina (FCS) correspondiente a los restos de aminoácidos 274-284 de SEQ ID NO: 1 (RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 8)) y una deleción de los restos de aminoácidos 365-394 del dominio Ib. Así, PE-LR contiene los restos de 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. PE-LR puede, opcionalmente, comprender además un péptido de unión GGS entre FCS y los restos de aminoácidos 395-613 de SEQ ID NO: 1.
- Como se observa anteriormente, alternativamente o adicionalmente, algo o todo del dominio Ib puede ser deleccionado con las porciones restantes unidas por un puente o directamente por un enlace peptídico. Alternativamente o adicionalmente, algo de la porción amino del dominio II puede ser deleccionado. Alternativamente o adicionalmente, el extremo C puede contener la secuencia nativa de los restos 609-613 (REDLK) (SEQ ID NO: 6), o puede contener una variación que puede mantener la capacidad de la PE para translocar en el citosol, tal como KDEL (SEQ ID NO: 5) o REDL (SEQ ID NO: 7), y repeticiones de estas secuencias. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.854.044; 5.821.238; y 5.602.095 y la publicación de solicitud de patente internacional WO 1999/051643. Puede usarse cualquier forma de PE en la que se haya eliminado o reducido la inmunogenicidad en combinación con cualquiera de la(s) sustitución (sustituciones) proporcionada(s) en el presente documento para uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B descritos en el presente documento mientras que siga siendo capaz de citotoxicidad a células dirigidas, por ejemplo, por translocación y ribosilación de EF-2 en una célula diana.
- Una realización de la divulgación proporciona una PE que comprende una secuencia de aminoácidos de PE que tiene una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 como se define por referencia a 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 aminoácidos E420, D463, Y481, R563, D581, D589 y K606 esté sustituido, en la que la PE tiene opcionalmente una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T, una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B, y/o una deleción de uno o más restos de aminoácidos

contiguos de los restos 1-273 y 285-394 como se define por SEQ ID NO: 1. Se ha descubierto que los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 están localizados dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de PE. Así, una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 puede eliminar, ventajosamente, uno o más epítomo(s) de linfocitos B. Por consiguiente, las PE proporcionadas en el presente documento pueden, ventajosamente, ser menos inmunogénicas que una PE sin sustituir (por ejemplo, no mutada).

La sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 en cualquiera de las PE descritas en el presente documento puede ser una sustitución por cualquier resto de aminoácido de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606. En una realización de la divulgación, la sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 en cualquiera de las PE descritas en el presente documento es una sustitución de, independientemente, alanina, glicina, serina, o glutamina en lugar de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606.

En una realización de la divulgación, la sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 en cualquiera de las PE descritas en el presente documento es una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos D463, Y481 y L516. En otra realización de la divulgación, la sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 en cualquiera de las PE descritas en el presente documento es una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, Y481, R563, D581, D589 y K606.

La sustitución de uno o más restos de aminoácidos en cualquiera de las PE descritas en el presente documento puede ser una sustitución de uno o más restos de aminoácidos localizados en un epítomo de linfocitos B humano o de ratón. Preferentemente, la sustitución de uno o más restos de aminoácidos es una sustitución de uno o más restos de aminoácidos localizados en un epítomo de linfocitos B humano. A este respecto, en una realización de la divulgación, la sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 en cualquiera de las PE descritas en el presente documento es una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563 y D581. Se ha descubierto que E420, D463, Y481, L516, R563 y D581 están localizados en epítomos de linfocitos B humanos de PE.

Además de la(s) sustitución (sustituciones) de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de PE descritos en el presente documento, la PE proporcionada en el presente documento también puede incluir, opcionalmente, sustitución (sustituciones) de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1. A este respecto, en una realización de la divulgación, la PE tiene una sustitución adicional de cualquier resto de aminoácido de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida de la divulgación, la sustitución adicional de uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 incluye una sustitución por alanina, glicina, serina o glutamina de uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1. La(s) sustitución (sustituciones) adicional(es) dentro de uno o más epítomos de linfocitos B pueden, ventajosamente, reducir adicionalmente la inmunogenicidad por la eliminación de uno o más epítomos de linfocitos B. La(s) sustitución (sustituciones) adicional(es) pueden localizarse dentro de cualquier epítomo de linfocitos B de PE adecuado. Epítomos de linfocitos B a modo de ejemplo se desvelan en, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 2007/016150, WO 2009/032954 y WO 2011/032022. En una realización preferida, la sustitución adicional de uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de, independientemente, alanina, glicina, serina o glutamina en lugar 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, K590, Q592, y L597, en la que 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, K590, Q592 y L597 se definen por referencia a SEQ ID NO: 1. En una realización particularmente preferida, la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución de, independientemente, alanina, glicina o serina en lugar de uno o más restos de aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505 y R538. En una realización especialmente preferida, la sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 es una sustitución de alanina en lugar del resto de aminoácido D463, y la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B es: (a) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R427; (b) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R458; (c) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R467; (d) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R490; (e) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R505; y (f) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.

Además de la(s) sustitución (sustituciones) de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de PE descritos en el presente documento, la PE proporcionada en el presente documento puede también incluir, opcionalmente, la sustitución (sustituciones) de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1. A este respecto, en una realización de la divulgación, la PE tiene una sustitución adicional por cualquier resto de aminoácido de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más

epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1. En una realización preferida de la divulgación, la sustitución adicional por uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1 incluye una sustitución por alanina, glicina, serina o glutamina de uno o más aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1. La(s) sustitución (sustituciones) adicional(es) dentro de uno o más epítomos de linfocitos T puede, ventajosamente, reducir adicionalmente la inmunogenicidad por la eliminación de uno o más epítomos de linfocitos T. La(s) sustitución (sustituciones) adicional(es) pueden localizarse dentro de cualquier epítomo de linfocitos T de PE adecuado. Epítomos de linfocitos T a modo de ejemplo se desvelan en, por ejemplo, la solicitud de patente provisional de EE.UU. N.º 61/495.085, presentada el 9 de junio de 2011. En una realización preferida, la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T es una sustitución por, independientemente, alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299, R302, y restos de aminoácidos en las posiciones 464-480, 482-515 y 517-519 como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.

La sustitución de uno o más restos de aminoácidos en las posiciones L294, L297, Y298, L299, R302, 464-480, 482-515 y 517-519 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 posiciones L294, L297, Y298, L299, R302, 464-480, 482-515 y 517-519 de SEQ ID NO: 1. La sustitución de uno o más restos de aminoácidos en las posiciones 464-480, 482-515 y 517-519 de SEQ ID NO: 1 puede incluir, por ejemplo, una sustitución por alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más restos de aminoácidos en la posición 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 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, 517, 518 y 519 de SEQ ID NO: 1. Una o más sustituciones en uno o más epítomos de linfocitos T localizados en las posiciones L294, L297, Y298, L299, R302, 464-480, 482-515 y 517-519 de PE como se define por referencia a SEQ ID NO: 1 puede reducir adicionalmente la inmunogenicidad de PE. En una realización, la secuencia de aminoácidos no tiene una sustitución de uno o más restos de aminoácidos en las posiciones 467, 485, 490, 505, 513 y/o 516.

La delección de uno o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 1-273 y 285-394 como se define por SEQ ID NO: 1 puede ser una delección de uno cualquiera o más de los restos de aminoácidos 1-273 y 285-394. En una realización de la divulgación, la delección de uno o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 1-273 y 285-394 como se define por SEQ ID NO: 1 puede ser una delección de todo o parte del dominio I (restos de aminoácidos 1-252 como se define por SEQ ID NO: 1); parte del dominio II (restos de aminoácidos 253-273 y 285-364 como se define por SEQ ID NO: 1); y/o uno o más de los restos de aminoácidos 365-394 como se define por SEQ ID NO: 1. En una realización de la divulgación, la PE comprende una secuencia de escisión por furina (FCS) que comprende restos de aminoácidos 274-284 como se define por SEQ ID NO: 1 y dominio III funcional (restos de aminoácidos 395-613 de SEQ ID NO: 1). Opcionalmente, la PE comprende un péptido de unión GGS entre la FCS y el dominio III funcional.

Preferentemente, 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. A este respecto, una realización de la divulgación proporciona PE con 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 por valina, leucina o isoleucina en lugar del resto de aminoácido R490, en la que el resto de aminoácido R490 se define por referencia a SEQ ID NO: 1. En una realización de la divulgación, la sustitución de uno o más restos de aminoácidos en las posiciones 313, 327, 331, 332, 431, 432, 505, 516, 538 y 590 definidas por referencia a SEQ ID NO: 1 con alanina o glutamina puede proporcionar una PE con una elevada citotoxicidad como se desvela, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2007/016150. Puede producirse elevada actividad citotóxica y reducida inmunogenicidad simultáneamente, y no son mutuamente excluyentes. Sustituciones que tanto aumentan la actividad citotóxica como disminuyen la inmunogenicidad, tales como sustituciones de R490 por glicina o, más preferentemente, alanina, son especialmente preferidas.

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



en la que:

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

FCS comprende una secuencia de escisión por furina de restos de aminoácidos, secuencia que es escindible por furina;

R¹ comprende 1 a 10 restos de aminoácidos;

R² comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 285-364 de SEQ ID NO: 1;

R³ comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 365-394 de SEQ ID NO: 1; y

el dominio III funcional de PE comprende los restos 395-613 de SEQ ID NO: 1 que tiene una sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 como se define por referencia a 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 aminoácidos E420, D463, Y481, R563, D581, D589 y K606

esté sustituido,

en la que la PE tiene opcionalmente una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T y/o una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B.

5 En una realización de la divulgación, m, n, y/o p de fórmula I son 0. En una realización de la divulgación, cuando m, n y p son cada uno 0, la PE de fórmula I puede comprender además un péptido de unión GGS entre FCS y el dominio III funcional de PE. En una realización de la divulgación, m es 1, p y n son cada uno 0, y R¹ comprende GGS.

10 Sin quedar ligado por teoría particular o mecanismo, se cree que las PE que contienen la secuencia de escisión por furina (FCS) se someten a procesamiento proteolítico dentro de las células diana, activando así la actividad citotóxica de la toxina La FCS de las PE proporcionadas en el presente documento puede comprender cualquier secuencia de escisión por furina adecuada de restos de aminoácidos, secuencia que es escindible por furina.
 15 Secuencias de escisión por furina a modo de ejemplo se describen en Duckert et al., Protein Engineering, Design & Selection, 17(1): 107-112 (2004) y la publicación de solicitud de patente internacional WO 2009/032954. En una realización de la divulgación, FCS comprende los restos 274-284 de SEQ ID NO: 1 (es decir, RHRQPRGWEQL (SEQ ID NO: 8)). La PE proporcionada en el presente documento puede también incluir, opcionalmente, sustitución (sustituciones) adicional(es) por cualquier aminoácido de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B y/o uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1. En una realización de la divulgación, la sustitución adicional por un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 es una sustitución por alanina, glicina, serina o glutamina del resto de 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 que existe de forma natural y X₂ es cualquier aminoácido que existe de forma 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), TSSRKRFRW (SEQ ID NO: 14), ASRRKARSW (SEQ ID NO: 15), RRVKRFW (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), HRQPRGWEQ (SEQ ID NO: 22), RQPRGWE (SEQ ID NO: 23), RHRKRGWEQL (SEQ ID NO: 24), RSKR (SEQ ID NO: 25), RHRKRGW (SEQ ID NO: 26), HRSKRGWE (SEQ ID NO: 27), RSKRGWEQL (SEQ ID NO: 28), HRSKRGWEQL (SEQ ID NO: 29), RHRSKR (SEQ ID NO: 30), y R-X₁-X₂-R, en la que X₁ es cualquier aminoácido que existe de forma natural y X₂ es arginina o lisina (SEQ ID NO: 4).

35 En una realización de la divulgación, p es 1, R² comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 285-364 de SEQ ID NO: 1 con una sustitución adicional opcional por cualquier aminoácido de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B y/o uno o más epítomos de linfocitos T. En una realización de la divulgación, la sustitución adicional por un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B es una sustitución por, independientemente, alanina, glicina, serina o glutamina de uno o más del resto de aminoácido E285, P290, R313, N314, P319, D324, E327, E331 y Q332 de SEQ ID NO: 1. En una realización de la divulgación, la sustitución adicional por un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T es una sustitución por, independientemente, alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299 y R302.

45 En otra realización adicional de la divulgación, m, n, y p son cada uno 0; FCS comprende los restos 274-284 de SEQ ID NO: 1; y la sustitución de uno o más de los restos de aminoácidos E420, D463, Y481, L516, R563, D581, D589 y K606 es una sustitución por alanina en lugar del resto de aminoácido D463 y la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B es: (a) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R427; (b) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R458; (c) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R467; (d) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R490; (e) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R505; y (f) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R538.

55 Además de la(s) sustitución (sustituciones) de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de PE descritos en el presente documento, la PE proporcionada en el presente documento puede también incluir, opcionalmente, sustitución (sustituciones) adicional(es) por cualquier aminoácido de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1. En otra realización de la divulgación, la PE tiene la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B y la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de SEQ ID NO: 1 incluye una sustitución por, independientemente, alanina, glicina, serina o glutamina de uno o más de los restos de aminoácidos D403, D406, R412, R427, E431, R432, R458, D461, R467, R490, R505, R513, E522, R538, E548, R551, R576, K590, Q592 y L597 de SEQ ID NO: 1 y/o una sustitución por valina, leucina o isoleucina en lugar del resto de aminoácido R490 de SEQ ID NO: 1.

65 Además de la sustitución (sustituciones) de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos B de PE descritos en el presente documento, la PE proporcionada en el presente documento puede también incluir, opcionalmente, sustitución (sustituciones) adicional(es) de cualquier aminoácido por uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T de SEQ ID NO: 1. En otra realización de la

divulgación, la PE tiene la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T y la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T es una sustitución por, independientemente, alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más de los restos de aminoácidos en las posiciones L294, L297, Y298, L299, y R302, 464-480, 482-515 y 517-519 de SEQ ID NO: 1. La sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T es como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la divulgación.

En una realización preferida de la divulgación, el dominio III funcional de PE comprende SEQ ID NO: 188, en la que X en la posición 26 es alanina, glicina, serina, glutamina o ácido glutámico; X en la posición 69 es alanina, glicina, serina, glutamina o ácido aspártico; X en la posición 87 es alanina, glicina, serina, glutamina o tirosina; X en la posición 122 es glicina, serina, glutamina o leucina; X en la posición 169 es alanina, glicina, serina, glutamina o arginina; X en 187 es alanina, glicina, serina, glutamina o ácido aspártico; X en la posición 195 es alanina, glicina, serina, glutamina o ácido aspártico; y X en la posición 212 es alanina, glicina, serina, glutamina o lisina, con la condición de que SEQ ID NO: 188 no comprenda los restos de aminoácidos 395-613 de SEQ ID NO: 1.

La PE proporcionada en el presente documento puede ser menos inmunogénica que una PE sin sustituir según la divulgación si la respuesta inmunitaria a la PE proporcionada en el presente documento se reduce, cuantitativa o cualitativamente, en comparación con la respuesta inmunitaria de una PE sin sustituir. Una disminución cuantitativa en la inmunogenicidad engloba una disminución en la magnitud o grado de la respuesta inmunitaria. La magnitud o grado de la inmunogenicidad puede medirse basándose en cualquier número de parámetros conocidos, tales como una disminución en el nivel de producción de citocinas (por ejemplo, citocina específica de antígeno) (concentración de citocinas), 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 en la inmunogenicidad engloba cualquier cambio en la naturaleza de la respuesta inmunitaria que convierte la respuesta inmunitaria en menos eficaz en mediar en la reducción de la actividad citotóxica de la PE. Se conocen en la técnica métodos de medición de la inmunogenicidad. Por ejemplo, medir la unión de PE a anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos previamente expuestos a PE) y/o medir la capacidad de la PE para inducir anticuerpos cuando se administran a un mamífero (por ejemplo, seres humanos, ratones, y/o ratones en los que el sistema inmunitario de ratón se sustituye por un sistema inmunitario humano) pueden medir la inmunogenicidad. Una PE menos inmunogénica puede caracterizarse por una disminución en la estimulación y/o activación de linfocitos B específicos para PE en comparación con la obtenida con una PE sin sustituir. Alternativamente o adicionalmente, PE menos inmunogénica puede caracterizarse por una disminución en la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas secretoras de anticuerpo y/o células de memoria en comparación con la obtenida con una PE sin sustituir. En una realización preferida, la inmunogenicidad reducida se caracteriza por una cualquiera o más de una disminución en la estimulación de linfocitos B, una disminución en la proliferación de linfocitos B y una disminución en la secreción de anticuerpos anti-PE. Pueden producirse simultáneamente reducción cualitativa y cuantitativa de la inmunogenicidad y no son mutuamente excluyentes.

Un experto habitual en la materia apreciará fácilmente que las PE proporcionadas en el presente documento pueden modificarse en cualquier número de formas, de forma que la eficacia terapéutica o profiláctica de las PE proporcionadas en el presente documento aumente mediante la modificación. Por ejemplo, las PE proporcionadas en el presente documento pueden conjugarse o fusionarse ya sea directamente o indirectamente mediante un conector a un resto de direccionamiento. A este respecto, una realización de la divulgación proporciona una molécula quimérica que comprende (a) un resto de direccionamiento conjugado o fusionado con (b) cualquiera de las PE proporcionadas en el presente documento descritas en el presente documento. La práctica de conjugar compuestos, por ejemplo, PE proporcionadas en el presente documento, con restos de direccionamiento es conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Wadwa et al., *J. Drug Targeting*, 3: 111 (1995), y la patente de EE.UU. 5.087.616.

El término "resto de direccionamiento" como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce específicamente y se une a un marcador de superficie celular, de forma que el resto de direccionamiento dirige la administración de la PE proporcionada en el presente documento a una población de células sobre 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, citocinas, y cualquier otro ligandos natural o no natural.

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos completos (también conocidos como "intactos") o porciones de unión al antígeno de los mismos que retienen el reconocimiento del antígeno y la capacidad de unión. El anticuerpo o porciones de unión al antígeno del mismo puede ser un anticuerpo que existe de forma natural o porción de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, un anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo aislado y/o purificado de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano, etc. El anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo puede estar en forma monomérica o polimérica. Por tanto, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo puede tener cualquier nivel de afinidad o avidez por el marcador de superficie celular. Deseablemente, el anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo es específico para el marcador de superficie celular, de forma que hay 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. Pueden injertarse o manipularse regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo o fragmentos variables monocatenarios (Fv) de un anticuerpo contra un
 5 marcador de superficie celular diana en un anticuerpo de elección para conferir especificidad por el marcador de superficie celular diana por ese anticuerpo. Por ejemplo, pueden injertarse las CDR de un anticuerpo contra un
 10 marcador de superficie celular diana sobre una región estructural 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; patentes de EE.UU. 5.859.205; 5.585.089; y 4.816.567; publicación de solicitud de
 15 patente europea 0173494; Jones et al., *Nature*, 321:522 (1986); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534 (1988), Riechmann et al., *Nature*, 332: 323 (1988); y Winter & Milstein, *Nature*, 349: 293 (1991)) para formar un anticuerpo que pueda fomentar poca o ninguna respuesta inmunogénica cuando se administra a un ser humano. En una
 20 realización preferida, el resto de direccionamiento es un anticuerpo monoclonal.

La porción de unión al antígeno puede ser cualquier porción que tenga al menos un sitio de unión al antígeno, tal como, por ejemplo, las regiones variables o CDR del anticuerpo intacto. Ejemplos de porciones de unión al antígeno de anticuerpos 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 monocatenario (scFv), o un fragmento Fc, Fab, Fab', Fv o F(ab)₂'; anticuerpos de un solo dominio (véanse, por ejemplo, Wesolowski, *Med Microbiol Immunol.*,
 20 198(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 de hélices estabilizadas (véase, por ejemplo, Arndt et al., *J. Mol. Biol.*, 312: 221-228 (2001); triacuerpos; diacuerpos (publicación de solicitud de patente europea 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 monocatenario ("scFvs", véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.888.773); anticuerpos estabilizados por disulfuro ("dsFvs", véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.747.654 y 6.558.672) y anticuerpos de dominio ("dAbs", véanse, 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)).

Métodos de prueba de anticuerpos o porciones de unión al antígeno de los mismos para la capacidad para unirse a cualquier marcador de superficie celular son conocidos en la técnica e incluyen cualquier ensayo de unión anticuerpo-antígeno tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway et al., abajo, y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2002/0197266 A1).

Métodos adecuados de preparación anticuerpos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos estándar de hibridoma en, por ejemplo, Köhler 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)). Alternativamente, se conocen en la técnica otros métodos, tales como métodos de hibridoma de VEB (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 en vector de bacteriófago (véase, por ejemplo, Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)). Además, se describen métodos de producción de anticuerpos en animales no humanos en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, y la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2002/0197266 A1.

También puede usarse presentación en fagos para generar el anticuerpo que puede usarse en las moléculas quiméricas de la divulgación. A este respecto, pueden generarse bibliotecas de fagos que codifican dominios variables (V) de unión al antígeno de anticuerpos usando biología molecular estándar y técnicas 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 unión específica al antígeno deseado, y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Secuencias de ácidos nucleicos 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 forma que los anticuerpos que tienen las características de anticuerpos monoclonales son secretados por la célula (véase, por ejemplo, Janeway et al., arriba, Huse et al., arriba, y la patente de EE.UU. 6.265.150).

Alternativamente, pueden producirse anticuerpos por ratones transgénicos que son transgénicos para genes de inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera específicos. Tales métodos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 5.545.806 y 5.569.825, y Janeway et al., arriba.

Alternativamente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo genéticamente modificado, por ejemplo, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos humanizados proporcionan ventajosamente un menor riesgo de efectos secundarios y pueden seguir en la circulación más tiempo. Se conocen en la técnica métodos de generación de anticuerpos humanizados y se describen en detalle en, por ejemplo, Janeway et al., arriba, las patentes de EE.UU. 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, patente europea 0239400 B1 y la patente de Reino Unido

2188638. También pueden generarse anticuerpos humanizados usando la tecnología de acondicionamiento superficial de anticuerpos descrita en, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.639.641 y Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235, 959-973 (1994).

5 El resto de direccionamiento puede unirse específicamente a cualquier marcador de superficie celular adecuado. La elección de un resto de direccionamiento particular y/o marcador de superficie celular puede elegirse dependiendo de la población de células particular que va a elegirse como diana. Se conocen en la técnica marcadores de superficie celular (véanse, 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
10 proteína o un hidrato de carbono. En una realización de la divulgación, el resto de direccionamiento es un ligando que se une específicamente a un receptor sobre una superficie celular. Ligandos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Fas, ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), una citocina (por ejemplo, IL-2, IL-15, IL-4, IL-13), una linfocina, 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. El término "antígeno de cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula (por ejemplo, proteína, péptido, lípido, hidrato de carbono, etc.) expresado o expresado en exceso únicamente o predominantemente por una célula
20 tumoral o célula cancerosa, de forma que el antígeno está asociado con el tumor o cáncer. El antígeno de cáncer puede ser además expresado por células normales, no tumorales o no cancerosas. Sin embargo, en tales casos, la expresión del antígeno de cáncer por células normales, no tumorales o no cancerosas no es tan robusta como la expresión por células tumorales o cancerosas. A este respecto, las células tumorales o cancerosas pueden expresar en exceso el antígeno o expresar el antígeno a un nivel significativamente más alto, en comparación con la
25 expresión del antígeno por células normales, no tumorales o no cancerosas. Por tanto, el antígeno de cáncer puede ser además expresado por células de un estado de desarrollo o maduración diferente. Por ejemplo, el antígeno de cáncer puede ser además expresado por células de la fase embrionaria o fetal, células que normalmente no se encuentran en un hospedador adulto. Alternativamente, el antígeno de cáncer puede ser además expresado por células madre o células precursoras, células que normalmente no se encuentran en un hospedador adulto.

30 El antígeno de cáncer puede ser un antígeno expresado por cualquier célula de cualquier cáncer o tumor, que incluye los cánceres y tumores descritos en el presente documento. El antígeno de cáncer puede ser un antígeno de cáncer de solo un tipo de cáncer o tumor, de forma que el antígeno de cáncer está asociado con o es característico de solo un tipo de cáncer o tumor. Alternativamente, el antígeno de cáncer puede ser un antígeno de cáncer (por
35 ejemplo, puede ser característico) de más de un tipo de cáncer o tumor. Por ejemplo, el antígeno de cáncer puede ser expresado por tanto células de cáncer de mama como de próstata y no es expresada en absoluto por células normales, no tumorales o no cancerosas.

Antígenos de cáncer a modo de ejemplo a los que el resto de direccionamiento puede unirse específicamente incluyen, pero no se limitan a, mucina 1 (MUC1), antígeno asociado a melanoma (MAGE), antígeno de melanoma preferencialmente expresado (PRAME), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSFR), CD56, receptor del factor de crecimiento epidérmico 2 humano (HER2/neu) (también conocido como erbB-2), CD5, CD7, antígeno de tumor de tirosinasa, proteína relacionada con tirosinasa (TRP)1,
45 TRP2, NY-ESO-1, telomerasa y p53. En una realización preferida, el marcador de superficie celular, al que el resto de direccionamiento se une específicamente, está seleccionado del grupo que consiste en agrupación 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 en, por ejemplo, cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de las trompas de Falopio, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, y cáncer pancreático. CD22 se expresa en, por ejemplo, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia prolinfocítica (PLL), linfoma no Hodgkin, linfoma linfocítico pequeño (LLP) y leucemia linfática aguda (LLA). CD25 se expresa en, por ejemplo, leucemias y linfomas, que incluye leucemia de células pilosas y linfoma de Hodgkin. El antígeno de Lewis Y se expresa en, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer
50 de pulmón y cáncer pancreático. CD33 se expresa en, por ejemplo, leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielomonocítica crónica (LMC) y trastornos mieloproliferativos.

En una realización de la divulgación, el resto de direccionamiento es un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de cáncer. Anticuerpos a modo de ejemplo que se unen específicamente a antígenos de cáncer incluyen,
60 pero no se limitan a, 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 de los mismos) y anticuerpos contra antígeno de Lewis Y (por ejemplo, B3 y variantes del mismo). A este respecto, el resto de direccionamiento puede ser un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en B3, RFB4,
65 SS, SS1, MN, MB, HN1, HN2, HB21 y MORAb-009, y porciones de unión al antígeno de los mismos. Restos de direccionamiento a modo de ejemplo adicionales adecuados para su uso en las moléculas quiméricas

proporcionadas en el presente documento se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 5.242.824 (anti-receptor de 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 EE.UU. 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 conocido en la técnica. Inmunotoxinas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, LMB-2 (Anti-Tac(Fv)-PE38), BL22 y HA22 (RFB4(dsFv)-PE38), SS1P (SS 1 (dsFv)-PE38), HB21-PE40, y variantes de las mismas. En una realización preferida, el resto de direccionamiento es la porción de unión al antígeno de HA22. HA22 comprende un fragmento Fv de anticuerpo anti-CD22 unido por 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 divulgación, 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 proporcionada en el presente documento con el resto de direccionamiento. Un experto habitual en la materia reconoce que sitios sobre la PE proporcionada en el presente documento, que no son necesarios para la función de la PE proporcionada en el presente documento, son sitios ideales para unir un conector y/o un resto de direccionamiento, a condición de que el conector y/o resto de direccionamiento, una vez unidos a la PE proporcionada en el presente documento, no interfieran con la función de la PE proporcionada en el presente documento, es decir, actividad citotóxica, inhiban el crecimiento de una célula diana, o traten o prevengan el cáncer. El conector puede ser capaz de formar enlaces covalentes con tanto la PE como el resto de direccionamiento. Se conocen en la técnica conectores adecuados e incluyen, pero no se limitan a, conectores de carbono de cadena lineal o ramificada, conectores de carbono heterocíclicos y conectores peptídicos. Donde la PE y el resto de direccionamiento son polipéptidos, el conector puede unirse a los aminoácidos mediante grupos laterales (por ejemplo, mediante un enlace disulfuro a cisteína). Preferentemente, los conectores se unirán al carbono alfa de los grupos amino y carboxilo de los aminoácidos terminales.

Incluidos en el alcance de la divulgación están porciones funcionales de las PE proporcionadas en el presente documento y moléculas quiméricas descritas en el presente documento. El término "porción funcional", cuando se usa en referencia a una PE o molécula quimérica, se refiere a cualquier parte o fragmento de la PE o molécula quimérica de la divulgación, parte o fragmento que retiene la actividad biológica de la PE o molécula quimérica de que la es una parte (la PE parental o molécula quimérica). Porciones funcionales engloban, por ejemplo, aquellas partes de una PE o molécula quimérica que retienen la capacidad de unirse específicamente a y destruir o inhibir el crecimiento de células diana o tratar o prevenir el cáncer, a un grado similar, el mismo grado, o a un grado más alto, que la PE parental o molécula quimérica. En referencia a la PE parental o molécula quimérica, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente el 10 % o más, aproximadamente el 25 % o más, aproximadamente el 30 % o más, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 68 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 95 % o más, de la PE parental o molécula quimérica.

La porción funcional puede comprender aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi de la porción, o en ambos extremos, aminoácidos adicionales que no se encuentran en la secuencia de aminoácidos de la PE parental o molécula quimérica. Deseablemente, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica de la porción funcional, por ejemplo, uniéndose específicamente a y destruyendo o inhibiendo el crecimiento de células diana, teniendo la capacidad de tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica de la PE parental o molécula quimérica.

Incluidas en el alcance de la divulgación están variantes funcionales de las PE proporcionadas en el presente documento y moléculas quiméricas descritas en el presente documento. El término "variante funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a una PE o molécula quimérica que tiene identidad de secuencia o similitud sustancial o significativa con una PE parental o molécula quimérica, variante funcional que retiene la actividad biológica de la PE o molécula quimérica de la que es una variante. Las variantes funcionales engloban, por ejemplo, aquellas variantes de la PE o molécula quimérica descritas en el presente documento (la PE parental o molécula quimérica) que retienen la capacidad de unirse específicamente a y destruir o inhibir el crecimiento de células diana a un grado similar, el mismo grado, o a un grado más alto, que la PE parental o molécula quimérica. En referencia a la PE parental o molécula quimérica, la variante funcional puede, por ejemplo, ser aproximadamente el 30 % o más, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, aproximadamente el 95 % o más, aproximadamente el 96 % o más, aproximadamente el 97 % o más, aproximadamente el 98 % o más, o aproximadamente el 99 % o más idéntica en secuencia de aminoácidos a la PE parental o molécula quimérica.

La variante funcional puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos de la PE parental o molécula quimérica con al menos una sustitución de aminoácidos conservativa. Se conocen en la técnica sustituciones de aminoácidos conservativas 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 de aminoácidos conservativa puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro ácido aminoácido (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, Ile, 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 sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral polar (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), etc.

Alternativamente o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos de la PE parental o molécula quimérica con al menos una sustitución de aminoácidos no conservativa. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácidos no conservativa no interfiera con o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. Preferentemente, la sustitución de aminoácidos no conservativa potencia la actividad biológica de la variante funcional, de forma que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con la PE parental o molécula quimérica.

La PE o molécula quimérica de la divulgación puede consistir esencialmente en la secuencia de aminoácidos especificada o secuencias descritas en el presente documento, de forma que otros componentes de la variante funcional, por ejemplo, otros aminoácidos, no cambien materialmente la actividad biológica de la variante funcional.

La PE o molécula quimérica de la divulgación (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) de la divulgación puede comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos que existen de forma natural. Tales aminoácidos sintéticos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexanocarboxílico, norleucina, ácido α -amino-n-decanoico, homoserina, S-acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolin-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida de ácido aminomalónico, N'-bencil-N'-metil-lisina, N',N'-dibencil-lisina, 6-hidroxilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentanocarboxílico, ácido α -aminociclohexanocarboxílico, ácido α -aminocicloheptanocarboxílico, 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 divulgación (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) puede estar glucosilada, amidada, carboxilada, fosforilada, esterificada, N-acilada, ciclada mediante, por ejemplo, un puente disulfuro, o convertirse en una sal de adición de ácido y/o opcionalmente dimerizarse o polimerizarse, o conjugarse.

Una realización de la invención proporciona un método de producción de la PE inventiva que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la PE para proporcionar la PE y (b) purificar la PE. Las PE y moléculas quiméricas de la divulgación (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) pueden obtenerse por métodos de producción de proteínas y polipéptidos conocidos en la técnica. Métodos adecuados de sintetizar *de novo* 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 la patente de EE.UU. 5.449.752. Por tanto, las PE y moléculas quiméricas de la divulgación pueden ser recombinantemente expresadas usando los ácidos nucleicos descritos en el presente documento usando métodos recombinantes estándar. Véanse, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

El método comprende además purificar la PE. Una vez expresadas, las PE inventivas pueden purificarse según técnicas de purificación conocidas en la técnica. 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 descritos en, por ejemplo, R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, NY (1982).

Otra realización de la invención proporciona un método de producción de la molécula quimérica inventiva que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula quimérica para proporcionar la molécula quimérica y (b) purificar la molécula quimérica. La molécula quimérica puede ser recombinantemente expresada y purificada como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la divulgación. En una realización de la divulgación, expresar recombinantemente la molécula quimérica comprende insertar una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de direccionamiento y una secuencia de nucleótidos que codifica una 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 codifica la PE en marco de manera que codifique un polipéptido continuo que incluye una región de resto de direccionamiento funcional y una región de PE funcional. En una realización de la divulgación, el método comprende unir una secuencia de nucleótidos que codifica la PE a una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de direccionamiento de manera que, tras la expresión, la PE se localice en el extremo carboxilo del resto de direccionamiento. En una realización alternativa, el método comprende unir una secuencia de nucleótidos que codifica la PE a una secuencia de nucleótidos que codifica un resto de direccionamiento de manera que, tras la expresión, la PE se localice en el extremo amino del resto de direccionamiento.

Todavía otra realización de la divulgación proporciona un método de producción de la molécula química proporcionada en el presente documento que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la PE proporcionada en el presente documento para proporcionar la PE, (b) purificar la PE, y (c) unir covalentemente un resto de direccionamiento a la PE purificada. La PE proporcionada en el presente documento puede ser recombinantemente expresada como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la divulgación. El método comprende además unir covalentemente un resto de direccionamiento a la PE purificada. El resto de direccionamiento puede ser como se describe en el presente documento con respecto a otros aspectos de la divulgación. El método de unir una PE a un resto de direccionamiento puede variar según la estructura química del resto de direccionamiento. Por ejemplo, el método puede comprender hacer reaccionar uno cualquiera o más de una variedad de grupos funcionales, por ejemplo, ácido carboxílico (COOH), amina libre (-NH₂), o grupos sulfhidrilo (-SH) presentes en la PE con un grupo funcional adecuado sobre el resto de direccionamiento, formando así una unión covalente entre la PE y el resto de direccionamiento. Alternativamente o adicionalmente, el método puede comprender modificar el resto de direccionamiento o PE para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La modificación también puede incluir unir uno o más conectores al resto de direccionamiento o PE.

En otra realización de la divulgación, las PE proporcionadas en el presente documento y moléculas químicas pueden producirse usando métodos no recombinantes. Por ejemplo, las PE proporcionadas en el presente documento y moléculas químicas descritas en el presente documento (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales) puede ser sintetizadas comercialmente por empresas tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, las PE proporcionadas en el presente documento y moléculas químicas pueden ser sintéticas, recombinantes, aisladas y/o purificadas.

Puede ser deseable, en algunas circunstancias, liberar la PE del resto de direccionamiento cuando la molécula química ha alcanzado una o más células diana. A este respecto, las moléculas químicas proporcionadas en el presente documento pueden comprender un conector escindible. El conector puede ser escindible por cualquier medio adecuado, por ejemplo, enzimáticamente. Por ejemplo, cuando la célula diana es un célula cancerosa (por ejemplo, tumor), la molécula química puede incluir un conector escindible en condiciones presentes en el sitio tumoral (por ejemplo, cuando se expone a enzimas asociadas a tumor o pH ácido).

Una realización de la divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las PE proporcionadas en el presente documento o las moléculas químicas proporcionadas en el presente documento descritas en el presente documento. El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser monocatenario o bicatenario, que puede sintetizarse u obtenerse (por ejemplo, aislarse y/o purificarse) de fuentes naturales, que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que pueden contener un enlace internucleotídico natural, no natural, o alterado, tal como un enlace fosforamidoato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. Generalmente, se prefiere que el ácido nucleico no comprenda ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. Sin embargo, puede ser adecuado en algunos casos, como se trata 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 uniendo segmentos naturales o sintéticos de ácidos nucleicos, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de aquellas descritas en (i) anteriormente. Para los fines en el presente documento, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

Los ácidos nucleicos pueden construirse basándose en síntesis química y/o reacciones de unión enzimática usando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., arriba, y Ausubel et al., arriba. Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser químicamente sintetizado usando nucleótidos que existen de forma natural o nucleótidos modificados de forma diversa diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse 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, dihidouracilo, 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-metil-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención pueden comprarse de empresas, tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

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

5 La secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas se hibrida preferentemente en condiciones de alta rigurosidad. Por "condiciones de alta rigurosidad" se indica que la secuencia de nucleótidos se hibrida específicamente con una secuencia diana (la secuencia de nucleótidos de cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento) en una cantidad que es detectablemente más fuerte que la hibridación no
10 específica. Condiciones de alta rigurosidad incluyen condiciones que distinguirían un polinucleótido con una secuencia complementaria exacta, o uno que contiene solo algunas discordancias dispersas, de una secuencia al azar que ocurre que solo tiene algunas regiones pequeñas (por ejemplo, 3-10 bases) que coincidieron con la secuencia de nucleótidos. Tales regiones de complementariedad pequeñas se funden más fácilmente que el complemento de longitud completa de 14-17 o más bases, y la hibridación de alta rigurosidad los hace fácilmente
15 distinguibles. Condiciones de rigurosidad relativamente alta incluirían, por ejemplo, condiciones de baja sal y/o alta temperatura, tales como se proporcionan por NaCl aproximadamente 0,02-0,1 M o el equivalente, a temperaturas de aproximadamente 50-70 °C. Tales condiciones de alta rigurosidad toleran poco, si algo, de discordancia entre la secuencia de nucleótidos y el molde o hebra diana, y son particularmente adecuadas para detectar la expresión de cualquiera de las PE proporcionadas en el presente documento o moléculas químéricas. Se aprecia generalmente
20 que las condiciones pueden volverse más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

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

Los ácidos nucleicos de la invención pueden incorporarse en un vector de expresión recombinante. A este respecto, la invención proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos de la invención. Para los fines en el presente documento, el término "vector de expresión recombinante" significa un construcción de oligonucleótido o polinucleótido genéticamente modificada que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por 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
30 condiciones suficientes para tener el ARNm, proteína, polipéptido o péptido expresado dentro de la célula. Los vectores de la invención no existen de forma natural en conjunto. Sin embargo, partes de los vectores pueden existir de forma natural. Los vectores de expresión recombinantes proporcionados en el presente documento pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, que incluye, pero no se limitan a, ADN y ARN, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios, que pueden sintetizarse u obtenerse en parte a partir de fuentes naturales, y que
35 pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos que existen de forma natural, que no existen de forma natural, o ambos tipos de enlaces. Preferentemente, los nucleótidos que no existen de forma natural o alterados o enlaces internucleotídicos no dificultan la transcripción o replicación del vector.

45 El vector de expresión recombinante de la invención puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier célula hospedadora adecuada. Vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o para ambos, tal como plásmidos y virus. El vector puede seleccionarse del 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 puede usarse vectores de bacteriófago, tales como λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NM1149. Ejemplos de vectores de expresión en planta incluyen pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Ejemplos de vectores de expresión en animal incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). Preferentemente, el vector de expresión recombinante es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral.
50

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden prepararse usando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas en, por ejemplo, Sambrook et al., arriba, y Ausubel et al., arriba. Pueden prepararse construcciones de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para contener un sistema de replicación funcional en una célula hospedadora procarionota o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivar, por ejemplo, de ColEI, plásmido 2 μ , λ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.
60

Deseablemente, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y de la traducción, que son específicos para el tipo de hospedador (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en el que el vector va a introducirse, según convenga y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN.
65

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de hospedadores transformados o transfectados. Genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un hospedador auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Genes marcadores adecuados para los vectores de expresión proporcionados en el presente documento incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, 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 operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica la PE proporcionada en el presente documento o molécula quimérica (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a o que se hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica la PE o molécula quimérica. La selección de promotores, por ejemplo, fuerte, débil, inducible, específico de tejido y específico del desarrollo, está dentro de la experiencia habitual del experto. Similarmente, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de la experiencia habitual del experto. 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 de los virus de células madre murinas.

Los vectores de expresión recombinantes proporcionados en el presente documento pueden diseñarse para ya sea expresión transitoria, para expresión estable, o para ambas. Por tanto, los vectores de expresión recombinantes pueden prepararse para expresión constitutiva o para expresión inducible.

Otra realización de la divulgación proporciona además una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, el término "célula hospedadora" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante inventivo. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota, por ejemplo, planta, 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 suspensa, es decir, una célula que crece en suspensión. Para los fines de producir una PE recombinante proporcionada en el presente documento o molécula quimérica, la célula hospedadora es preferentemente una célula procariota, por ejemplo, una célula de *E. coli*.

También se proporciona por la divulgación una población de células que comprende al menos una célula hospedadora descrita en el presente documento. La población de células pueden 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. Alternativamente, la población de células pueden ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente (por ejemplo, consiste esencialmente en) células hospedadoras que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una única célula hospedadora que comprende un vector de expresión recombinante, de forma que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la divulgación, 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 proporcionadas en el presente documento, 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 pueden aislarse y/o purificarse. El término "aislado", como se usa en el presente documento, significa que ha sido sacado de su entorno natural. El término "purificado", como se usa en el presente documento, significa que ha sido aumentado en pureza, en el que "pureza" es un término relativo, y no debe interpretarse necesariamente como pureza absoluta. Por ejemplo, la pureza puede ser aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 90 % o más, o aproximadamente el 100 %. La pureza es preferentemente aproximadamente el 90 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 95 %) y más preferentemente aproximadamente el 98 % o más (por ejemplo, aproximadamente el 98 % a aproximadamente el 99 %).

Las PE proporcionadas en el presente documento, 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, todos los cuales se denominan conjuntamente "materiales de PE proporcionados en el presente documento" en lo sucesivo, puede formularse en una composición, tal como una composición farmacéutica. A este respecto, la divulgación 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 proporcionada en el presente documento que contiene cualquiera de los materiales de PE proporcionados en el presente documento puede comprender más de un material de PE proporcionado en el presente documento, por ejemplo, un polipéptido y un ácido nucleico, o dos o más PE diferentes. Alternativamente, la composición

farmacéutica puede comprender un material de PE proporcionado en el presente documento en combinación con uno o varios de otros agentes farmacéuticamente activos o fármacos, tales como agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cisplatino, daunorubicina, doxorubicina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiaurea, metotrexato, paclitaxel, rituximab, vinblastina, vincristina, etc.

5 Preferentemente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. Con respecto a composiciones farmacéuticas, el vehículo puede ser cualquiera de aquellos convencionalmente usados y está limitado solo por consideraciones químico-físicas, tales como solubilidad y falta de reactividad con el (los) compuesto(s) activo(s), y por la vía de administración. Los vehículos farmacéuticamente aceptables descritos en el presente documento, por ejemplo, vehículos, adyuvantes, excipientes y diluyentes, son muy conocidos para aquellos expertos en la materia y están fácilmente disponibles para el público. Se prefiere que el vehículo farmacéuticamente aceptable sea uno que es químicamente inerte para el (los) agente(s) activo(s) y uno que no tenga efectos secundarios perjudiciales o toxicidad en las condiciones de uso.

15 La elección del vehículo será determinada en parte por el particular material de PE proporcionado en el presente documento, además de por el método particular usado para administrar el material de PE proporcionado en el presente documento. Por consiguiente, hay una variedad de formulaciones adecuadas de la composición farmacéutica de la invención. Las siguientes formulaciones para administración parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intrarterial, intramuscular, intradérmica, interperitoneal e intratecal), oral, y aerosol, son a modo de ejemplo y no son de ninguna forma limitantes. Puede usarse más de un vía para administrar los materiales de PE proporcionados en el presente documento, y en ciertos casos, una vía particular puede proporcionar una respuesta más inmediata y más eficaz que otra vía.

25 Las formulaciones tópicas son muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Tales formulaciones son particularmente adecuadas en el contexto de la invención para aplicación a la piel.

30 Formulaciones adecuadas para administración por vía oral pueden incluir (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del material de PE proporcionado en el presente documento disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o zumo de naranja; (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas para chupar, y trociscos, cada uno que contiene una cantidad predeterminada del principio activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, y los poli(alcoholes de etileno), ya sea con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsula pueden ser del tipo de gelatina de vaina dura o blanda habitual que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes de tamponamiento, agentes disgregantes, agentes humidificantes, conservantes, aromatizantes, y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastilla para chupar pueden comprender el material de PE proporcionado en el presente documento en un aroma, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto, además de pastillas que comprenden el material de PE proporcionado en el presente documento en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones, geles, y similares, que contienen además tales excipientes como se conoce en la técnica.

45 El material de PE proporcionado en el presente documento, solo o en combinación con otros componentes adecuados, puede prepararse en formulaciones en aerosol para ser administradas mediante inhalación. Estas formulaciones en aerosol pueden ponerse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. Las formulaciones en aerosol también pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tales como en un nebulizador o un atomizador. Tales formulaciones de spray también pueden usarse para pulverizar la mucosa.

55 Formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas y no acuosas para inyección estéril isotónica, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que puede incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizadores y conservantes. El material de PE proporcionado en el presente documento puede administrarse en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, tal como un líquido estéril o mezcla de líquidos, que incluye 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, sulfóxido de dimetilo, glicerol, cetales tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres o glicéridos de ácidos grasos, 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, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

65 Aceites, que pueden usarse en formulaciones parenterales, incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o

sintéticos. Ejemplos específicos de aceites incluyen cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, petrolato y mineral. Ácidos grasos adecuados para su uso en las formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. Oleato de etilo y miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

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

15 Las formulaciones parenterales normalmente contendrán de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 25 % en peso del material de PE proporcionado en el presente documento en solución. Pueden usarse conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de 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 normalmente oscilará de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 15 % en peso. Tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos
20 grasos de sorbitano de polietilenglicol, tales como monooleato de sorbitano y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales pueden presentarse en envases sellados de dosis unitaria o multi-dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que solo requiere la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de uso. Pueden
25 prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito. Los requisitos para vehículos farmacéuticos eficaces para composiciones parenterales son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia (véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)).

30 Se apreciará por un experto en la materia que, además de las composiciones farmacéuticas anteriormente descritas, los materiales de PE proporcionados en el presente documento de la invención pueden formularse 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 proporcionado en el presente documento administrado debe ser suficiente para efectuar una respuesta deseada, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el mamífero durante un periodo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del material de PE proporcionado en el presente documento debe ser suficiente para inhibir el crecimiento de una célula diana o tratar o prevenir cáncer en un periodo de aproximadamente 2 horas o más, por ejemplo, 12 a 24 o más horas, desde el
40 momento de administración. En ciertas realizaciones, el periodo de tiempo podría ser incluso más largo. La dosis será determinada por la eficacia del material de PE proporcionado en el presente documento particular y la afección del mamífero (por ejemplo, ser humano), además del peso corporal del mamífero (por ejemplo, ser humano) que va a tratarse.

45 Se conocen en la técnica muchos ensayos para determinar una dosis administrada. Una dosis administrada puede determinarse *in vitro* (por ejemplo, cultivos celulares) o *in vivo* (por ejemplo, estudios en animales). Por ejemplo, una dosis administrada puede determinarse determinando la CI_{50} (la dosis que logra una inhibición al 50 % de síntomas), DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población), la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población) y el índice terapéutico en cultivo celular y/o estudios en animales. El índice terapéutico es la relación de
50 DL_{50} con respecto a la DE_{50} (es decir, DL_{50}/DE_{50}).

La dosis del material de PE proporcionado en el presente documento también será determinada por la existencia, naturaleza y grado de cualquier efecto secundario adverso que pudiera acompañar a la administración de un material de PE proporcionado en el presente documento particular. Normalmente, el médico adjunto decidirá la
55 dosificación del material de PE proporcionado en el presente documento con la que para tratar cada paciente individual, teniendo en cuenta una variedad de factores, tales como la edad, peso corporal, salud general, dieta, sexo, material de PE proporcionado en el presente documento que va a administrarse, vía de administración, y la gravedad de la afección que está tratándose. A modo de ejemplo y no pretendiendo limitar la invención, la dosis del material de PE proporcionado en el presente documento puede ser aproximadamente 0,001 a aproximadamente
60 1000 mg/kg de peso corporal del sujeto que está tratándose/día, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal/día, 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, aproximadamente 25 a aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal/día, o aproximadamente 10
65 mg/kg de peso corporal/día.

Alternativamente, los materiales de PE proporcionados en el presente documento pueden modificarse en una forma de liberación prolongada, de forma que el modo en el que el material de PE proporcionado en el presente documento se libera en el cuerpo al que se administra esté controlado con respecto al tiempo y la localización dentro del cuerpo (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.450.150). Formas de liberación prolongada de los materiales de PE proporcionados en el presente documento pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los materiales de PE proporcionados en el presente documento y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en el que se encapsulan los materiales de PE proporcionados en el presente documento, o difunden a través del material y/o degradación del material no poroso. El depósito se implanta entonces en la localización deseada dentro del cuerpo y los materiales de PE proporcionados en el presente documento son liberados del implante a una tasa predeterminada.

Los materiales de PE proporcionados en el presente documento pueden ensayarse para citotoxicidad por ensayos conocidos en la técnica. 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 de Roche Applied Sciences), como se describe en la publicación de solicitud de patente internacional WO 2011/032022.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento, PE, moléculas quiméricas, ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células hospedadoras, o poblaciones de células, pueden usarse en métodos de tratamiento o prevención del cáncer. Sin quedar ligado por teoría particular o mecanismo, se cree que las PE proporcionadas en el presente documento destruyen o inhiben el crecimiento de células mediante la inhibición de la síntesis de proteínas en células eucariotas, por ejemplo, por la inactivación de la ribosilación del ADP del factor de elongación 2 (EF-2). Sin quedar ligado a teoría particular o mecanismo, las moléculas quiméricas proporcionadas en el presente documento reconocen y se unen específicamente a marcadores de superficie celular, administrando así la PE citotóxica a la población de células que expresa el marcador de superficie celular con reactividad cruzada mínima o sin reactividad cruzada con células que no expresan el marcador de superficie celular. De esta forma, la citotoxicidad de PE puede ser elegida como diana para destruir o inhibir el crecimiento de una población de células particular, por ejemplo, células cancerosas. A este respecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de 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 descritos en el presente documento, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer en el mamífero.

Los términos "tratar" y "prevenir", además de palabras que proceden de los mismos, como se usa en el presente documento, no implican necesariamente el 100 % o tratamiento completo o prevención. Más bien, hay grados variables de tratamiento o prevención que un experto habitual en la materia reconoce como que tienen un posible beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos proporcionados en el presente documento pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención del cáncer en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el método proporcionado en el presente documento puede incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad, por ejemplo, cáncer, que está tratándose o previniéndose. Por tanto, para los fines en el presente documento, "prevención" puede englobar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma.

Para los fines de los métodos proporcionados en el presente documento, en los que se administran células hospedadoras o poblaciones de células, las células pueden ser células que son alogenas o autólogas al hospedador. Preferentemente, las células son autólogas al hospedador.

Con respecto a los métodos proporcionados en el presente documento, el cáncer puede ser cualquier cáncer, que incluye cualquiera de cáncer de la glándula suprarrenal, sarcomas (por ejemplo, sarcoma sinovial, sarcoma osteogénico, leiomioma, fibroma, lipoma y teratoma), linfomas (por ejemplo, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de Hodgkin y linfoma no de 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 (LPL), leucemia mielomonocítica (aguda y crónica) y leucemia linfocítica (aguda y crónica)), cáncer de huesos (sarcoma osteogénico, fibrosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, linfoma maligno (sarcoma de células del retículo), mieloma múltiple, tumor maligno de células gigantes, 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 las trompas de Falopio, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal, o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer de la vía biliar intrahepática, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar o pleura, cáncer de la nariz, fosa nasal, u oído medio, cáncer de la cavidad bucal, cáncer de vulva (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma intraepitelial, adenocarcinoma y fibrosarcoma), trastornos mieloproliferativos (por ejemplo, cáncer mieloide crónico), cánceres de colon (por ejemplo, carcinoma de colon), cáncer de esófago (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, leiomioma y linfoma), cáncer de cuello uterino (carcinoma cervical y displasia cervical 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 (célula escamosa, célula pequeña no diferenciada, célula grande no diferenciada y adenocarcinoma), carcinoma alveolar (bronquiolar), adenoma bronquial, hamartoma condromatoso, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas y adenocarcinoma de pulmón), mesotelioma maligno, cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas, sarcoma de Kaposi, nevos, nevos displásicos, lipoma, angioma, dermatofibroma y queloides), mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, cáncer de ovario (por ejemplo, carcinoma de ovario (cistoadenocarcinoma seroso, cistoadenocarcinoma mucinoso, carcinoma endometriode y adenocarcinoma de células claras), tumores de células de la granulosa-teca, tumores de células de Sertoli-Leydig, disgerminoma y teratoma maligno), cáncer pancreático (por ejemplo, adenocarcinoma ductal, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, tumores carcinoideos y vipoma), peritoneo, omento, cáncer de mesenterio, 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 carcinoideos, sarcoma de Kaposi, leiomioma, hemangioma, lipoma, neurofibroma y fibroma), cáncer de tejido blando, cáncer de estómago (por ejemplo, carcinoma, linfoma y leiomiomasarcoma), cáncer testicular (por ejemplo, seminoma, teratoma, carcinoma embrionario, teratocarcinoma, coriocarcinoma, sarcoma, tumor de células de Leydig, fibroma, fibroadenoma, tumores adenomatoides y lipoma), cáncer de útero (por ejemplo, carcinoma endometrial), cáncer de tiroides y cánceres uroteliales (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células transitorias, adenocarcinoma, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria).

Como se usa en 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 hámsteres, y mamíferos del orden lagomorfos, tales como conejos. Se prefiere que los mamíferos sean del orden carnívoros, que incluye felinos (gatos) y caninos (perros). Es más preferido que los mamíferos sean del orden artiodáctilos, que incluyen bovinos (vacas) y caprinos (cerdos) o del orden perisodáctilos, que incluyen equinos (caballos). Lo más preferido es que los mamíferos sean del orden primates, cébidos o simioides (monos) o del orden antropoides (seres humanos y simios superiores). Un mamífero especialmente preferido es el ser humano.

También se proporciona un método de inhibición del 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, descritos en el presente documento, en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de la célula diana. El crecimiento de la célula diana puede inhibirse por cualquier cantidad, por ejemplo, por aproximadamente el 10 % o más, aproximadamente el 15 % o más, aproximadamente el 20 % o más, aproximadamente el 25 % o más, aproximadamente el 30 % o más, aproximadamente el 35 % o más, aproximadamente el 40 % o más, aproximadamente el 45 % o más, aproximadamente el 50 % o más, aproximadamente el 55 % o más, aproximadamente el 60 % o más, aproximadamente el 65 % o más, aproximadamente el 70 % o más, aproximadamente el 75 % o más, aproximadamente el 80 % o más, aproximadamente el 85 % o más, aproximadamente el 90 % o más, aproximadamente el 95 % o más, o aproximadamente el 100 %. La célula diana puede proporcionarse en una muestra biológica. Una muestra biológica puede obtenerse de un mamífero en cualquier modo adecuado y de cualquier fuente adecuada. La muestra biológica puede, por ejemplo, obtenerse por una extracción de sangre, leucaféresis, y/o biopsia de tumor o necropsia. La etapa de poner en contacto puede tener lugar *in vitro* o *in vivo* con respecto al mamífero. Preferentemente, la puesta en contacto es *in vitro*.

En una realización de la divulgación, la célula diana es una célula cancerosa. La célula diana puede ser una célula cancerosa de cualquiera de los cánceres descritos en el presente documento. En una realización de la divulgación, la diana pueden 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 divulgación. El marcador de superficie celular puede estar seleccionado, por ejemplo, del grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y.

Ejemplos

Recogida de muestras de sangre completa del paciente, almacenamiento y aislamiento de ARN: Se obtuvieron muestras de sangre de 6 pacientes que se trataron con inmunotoxinas recombinantes (RIT). Se recogieron muestras de sangre de 2,5 ml en tubos PAXGENE que contenían un detergente catiónico y sales aditivas (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Suiza), se mezclaron minuciosamente invirtiendo el tubo suavemente 4-6 veces y se incubaron a temperatura ambiente 10 horas, y luego se almacenaron a -80 °C. Se purificó el ARN intracelular de muestras de sangre completa del paciente usando el kit PAXGENE Blood RNA (PreAnalytiX) según las instrucciones del fabricante y se guardó a -80 °C.

Síntesis de ADNc de cadena pesada y cadena ligera, amplificación por PCR y ensamblaje de genes de ScFv: Se conectó un sitio de enzima de restricción o conector de vector (Tabla 2) a algunos cebadores. Se prepararon por separado repertorios de cadena pesada y repertorios de cadena ligera y se conectaron con un conector para proporcionar la formación de ScFv. Se prepararon repertorios de cadena pesada a partir de IgG que tiene linfocitos

B maduros. La síntesis de ADNc de primera hebra se realizó usando un kit de síntesis de ADNc de primera hebra (GE Healthcare, NJ) con un cebador de región constante de IgG: HuIgG1-4CH1FOR (Tabla 2). Se prepararon repertorios de cadena ligera a partir de genes Vk usando un cebador de región constante κ: HuGκFOR (Tabla 2). Se añadieron 40 pmoles de cebadores a 15 µl de mezcla de reacción para la síntesis de ADNc.

5 Se amplificaron genes V_H y V_K por separado por un proceso de tres etapas usando la producción de síntesis de ADNc de primera hebra. Se usaron el cebador de región constante de IgG: HuIgG1-4CH1FOR y una mezcla equimolar de los cebadores inversos V_H humanos basados en familia apropiados (Tabla 2) en la PCR de primera etapa para cubrir el gen V_H en el ARN intracelular de muestras de sangre completas del paciente. Se usaron un
10 cebador de región constante κ: HuGκFOR y los cebadores inversos V_K humanos basados en familia apropiados (Tabla 2) para el gen V_K. Se llevó a cabo la PCR de primera etapa usando polimerasa de alta fidelidad PHUSION (New England Biolabs, Ipswich, MA) en un volumen final de 50 µl de mezcla de reacción con 10 pmoles de cada cebador según la recomendación del fabricante.

15 Se usó la polimerasa de alta fidelidad PRIMESTAR (Takara, Kioto, Japón) para la PCR de segunda etapa, PCR de corte y empalme por extensión por solapamiento (SOE), y la última etapa para insertar la preparación con 10 pmoles de cada cebador según la recomendación del fabricante. Se conectó la secuencia de 5'-GCC CAG CCG GCC ATG GCC- 3' (SEQ ID NO: 185) que incluye un sitio NcoI (subrayado) a cebadores inversos V_H humanos para cebadores inversos nco V_H humanos (Tabla 2). Se usó el vector pCANTAB para la construcción de la biblioteca de fagos. Se
20 conectó la secuencia de 5'-ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC- 3' (SEQ ID NO: 186) que incluye un conector pCANTAB a cebadores directos J_H humanos para los cebadores de conector directo J_H humanos. Se usaron cebadores nco inversos V_H humanos y cebadores de conector directos J_H humanos en la segunda PCR para añadir un sitio Nco I en la parte trasera del gen V_H y un conector pCANTAB delante del gen V_H.

25 En la segunda etapa para amplificar el gen V_K, se conectó la secuencia de 5'-GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC- 3' (SEQ ID NO: 187) que incluye un conector pCANTAB a cebadores inversos V_K humanos para cebadores de conector inverso V_K humanos. La secuencia de 5'-GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC- 3' (SEQ ID NO: 184) que incluye un sitio NotI (doble subrayado) se conectó a cebadores directos J_K humanos para cebadores Not directos J_K humanos. Se usaron cebadores inversos V_K humanos y cebadores directos J_K
30 humanos en la segunda PCR para añadir un sitio Not I delante y un conector pCANTAB en la parte trasera del gen V_K.

Se prepararon genes V_H y V_K en la tercera etapa por separado usando (a) el par de cebadores de cebadores Nco inversos V_H humanos y un cebador de conector pCANTAB de conector R' (Tabla 2) para el gen V_H, y (b) el par de
35 cebadores de cebadores not directo J_K humanos y un cebador de conector pCANTAB del conector F' (Tabla 2) para el gen V_K.

Los cebadores de conector R' y conector F' que se usaron en la tercera etapa fueron cebadores complementarios. Los genes V_H y V_K se combinaron para proporcionar una formación de ScFv usando SOE-PCR. Finalmente, el
40 fragmento de biblioteca de ScFv se amplificó usando los cebadores de VHlgGFOR y VLREV (Tabla 2) para la preparación de inserciones.

Construcción de biblioteca de fagos: El fragmento ScFv amplificado se digirió con NcoI y NotI, y se subclonó en pCANTAB 5E digerido con las mismas enzimas para construir la biblioteca de ScFv usando T4 ligasa. La solución de
45 ligación se purificó por extracción con columna de centrifugación QIAQUICK (Qiagen, Valencia, CA), y se resuspendió en agua. La concentración resultante fue aproximadamente 50 ng/ml. Se sometieron a electroporación muestras de 4 µl en 50 µl de células electrocompetentes TG1 (Lucigen, WI) usando un pulsador de genes y unidad de control de pulsos (Bio-Rad Laboratories) y se repitió 6 veces para una biblioteca de tamaño grande. Se incubaron células en 6 ml de SOC (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 1 h a 37 °C con agitación a aproximadamente 250 rpm.
50 Se recogió una muestra de 20 µl, se diluyó y se sembró en una placa de TYE ampicilina para calcular el tamaño de biblioteca. Se añadió medio 2YT en una cantidad de 6 ml con 200 µg/ml de ampicilina y 4 % de glucosa y se incubó 1 h adicional. El medio se enrasó hasta 200 ml con medio 2YT con 100 mg/ml de ampicilina y 2 % de glucosa. Las células se cultivaron a DO₆₀₀ = 0,4 y se infectaron por 10¹¹ ufp de fago auxiliar M13K07 (New England Biolaboratories) con agitación a 250 rpm durante 30 min después de reposar 30 min. Las células se recogieron
55 durante 5 min a 5.000 rpm en un rotor GSA y se resuspendieron en medio 2YT en una cantidad de 100 ml con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina durante la noche a 30 °C con agitación a 250 rpm.

Los fagos se precipitaron del sobrenadante con 1/5 volumen de PEG/NaCl (20 % de polietilenglicol 6000, NaCl 2,5 M) y se resuspendieron con medio 2YT. Se determinó el título de la biblioteca de fagos haciendo diluciones
60 sucesivas de 10 µl de fago y añadiendo 90 µl de células TG1, DO₆₀₀ = 0,4, se sembraron en agar LB complementado con 100 µg/ml de Amp y 1 % de glucosa. Se determinó el número de colonias después del crecimiento durante la noche, y se calculó el título.

Inmunopurificación de la biblioteca de fagos: Se usó LMB-9 (B3(dsFv)-PE38, específico para un antígeno de Lewis Y) como antígeno para la inmunopurificación de la biblioteca de fagos. Se biotiniló LMB9 usando EZ-Link sulfo-NHS-
65 Biotina (Thermo Scientific, Rockford, IL) en una relación molar de 50:1, y se determinó el número de grupos biotina

en cada LMB9-biotina usando el kit de cuantificación de biotina (Thermo Scientific, Rockford, IL) según las instrucciones del fabricante. Se bloquearon previamente 50 ml de fago y perlas magnéticas modificadas con estreptavidina (DYNABEADS MIONE Streptavidin T1, diámetro 1 µm, capacidad de unión de Ig biotinilada 40-50 µg mg⁻¹, hidrófoba, perlas activadas con tosilo (Invitrogen)) en 3 % de BSA/ solución salina tamponada con fosfato y Tween (polisorbato) 20 (PBST) (0,1 % de Tween-20). El fago se aplicó para el descarte de perlas.

Se usó una gradilla magnética para separar las perlas de la fase líquida causando que las perlas se inmovilizaran a lo largo del lado del tubo. Se eliminó el tampón de bloqueo, y las perlas se resuspendieron en solución de fago y se incubaron a temperatura ambiente en rotor durante 30 min. Se cambió la solución de fago a otro tubo con perlas previamente bloqueadas para el descarte adicional. El descarte se repitió con 1 mg de perlas durante dos veces y 2 mg de perlas una vez. El fago se cambió a un tubo previamente bloqueado, y se añadió antígeno de LMB9-biotina biotinilado para permitir que los complejos de fago-antígeno-biotina se formaran con LMB9-biotina en una cantidad de 10 µg durante la primera ronda y 5 µg durante las rondas posteriores. La solución de reacción se incubó a temperatura ambiente en rotor durante 2 h y retiraron a un tubo con 2 mg de perlas durante 45 min de incubación adicionales en rotor. El sobrenadante se eliminó, 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). Esta es la salida de la inmunopurificación, y se rescató para rondas de inmunopurificación adicionales, y se calculó el título. Se usó el fago de salida en una cantidad de 0,6 µl para infectar 5 ml de TG1 (DO600=0,4) para el rescate.

ELISA de fagos y secuenciación de clones de fago: Tras tres o cuatro rondas de inmunopurificación y rescate de fagos, se seleccionaron 198 clones individuales de la ronda final de inmunopurificación para análisis adicional. Se movió un clon señal a una placa de 96 pocillos de fondo redondo con 150 µl de medio 2YT (100 µg/ml de ampicilina, 2 % de glucosa) durante 4 h a 37 °C con agitación a 250 rpm, y se añadieron 10⁸ ufp de fago auxiliar M13K07 en 50 µl de medio 2YT (100 µg/ml de ampicilina, 2 % de glucosa) al pocillo con agitación a 250 rpm durante 30 min después de reposar 30 min. Se recogieron las células por 2700 rpm durante 10 min con inserciones para las placas de 96 pocillos y se resuspendieron en medio 2YT en una cantidad de 200 µl con 100 µg/ml de ampicilina y 50 µ/ml de kanamicina durante la noche a 30 °C con agitación a 250 rpm. El sedimento se resuspendió con 100 µl de medio 2YT con 100 µg/ml de ampicilina, 2 % de glucosa y 30 % de glicerol y se guardó a -80 °C para reserva. Los fagos se precipitaron del sobrenadante para ELISA de fagos por 2700 rpm durante 10 min. Se recubrió una placa NUNC MAXISORP de fondo plano de 96 pocillos (Nunc USA, Rochester, NY) con LMB9 (5 µg/ml en PBS) durante la noche a 4 °C. La placa se lavó y se bloqueó con 2 % de leche desnatada (señalización de células). Se añadieron el sobrenadante con fago (50 µl) y 2 % de leche (50 µl) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con PBST, y se añadió anti-M13 conjugado con peroxidasa (1:1000, GE Healthcare, Waukesha, WI) durante 1 h a temperatura ambiente. La placa se lavó 3 veces con 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. Se recogió el clon positivo para el aislamiento de fagos a pequeña escala del pocillo apropiado de la placa de reserva, y se realizó la secuenciación usando el kit BIGDYE Terminator v1.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se eliminaron los clones con la misma secuencia, y las secuencias resultantes se alinearon con IMGTV-Quest (www.imgt.org/IMGTVquest/vquest).

ICC-ELISA de competición: Se preparó el fago-anticuerpo con el método anteriormente mencionado con un cultivo de escala de 20 ml. La dilución de fago-anticuerpo se determinó con ELISA. Se añadió anticuerpo SS1P en una cantidad de 50 µl/pocillo a una concentración de 1 µg/ml en 2 % de leche desnatada a placas de ELISA recubiertas durante la 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 de fago-anticuerpo se determinó por una curva de dilución, y la A450 deseada se estableció a aproximadamente 1,0. Se realizó un ensayo de ICC-ELISA de competición 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. Se mezcló fago-anticuerpo con diluciones sucesivas del mutante individual durante la noche a 4 °C y se añadió a la placa de ELISA de combinación de SS1P-rFc-mesotelina. La competición del mutante individual por la unión de fago-anticuerpo a SS1P se determinó midiendo la unión restante de fago-anticuerpo usando anti-M13 conjugado con HRP. El efecto de competición se normalizó a la unión a HA22-LR en la que PE38 careció de una sustitución.

Antigenicidad del suero: Se analizó la unión de HA22 o HA22 sustituido a anticuerpos en sueros humanos en un ensayo de desplazamiento. Se obtuvieron sueros humanos bajo el protocolo 10C0066. Se añadió mesotelina-rFc a la placa de ELISA (100 ng en 50 µl de PBS/pocillo) y se incubó durante la noche a 4 °C. Después de lavar, se añadió un anti-mesotelina/SS1P (100 ng en 50 µl de tampón de bloqueo/pocillo) durante 1 h para capturar anticuerpos anti-PE38 humanos no unidos. En tubos separados, se mezclaron sueros (diluciones de 97 a 30658 veces) con 2 µg/ml de HA22 o HA22 sustituido y se incubaron durante la 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 HA22 o HA22 sustituido se capturaron por SS1P y se detectaron por Fc de IgG anti-humana de conejo conjugada 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 por

SoftMaxPro 4.0 (Molecular Devices). Los valores de Cl_{50} indican la concentración de RIT que inhibe el 50 % de la reactividad del anticuerpo con SS1P.

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

Ejemplo 1

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

Se obtuvieron muestras de sangre de 6 pacientes que se trataron con diferentes inmunotoxinas recombinantes (RIT) que contenían PE38 (Tabla 1). Se aisló ARN de muestras de sangre usando los kits PAXGENE Blood RNA (PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Suiza). Se sintetizó ADNc de primera hebra a partir de ARN usando cebadores con la región constante apropiada (Tabla 2). Se obtuvieron bandas individuales del tamaño correcto para ADNc de V_H y V_k usando el ADNc de primera hebra como molde. Se amplificaron fragmentos de V_H y V_L individualmente en tres etapas. Se añadieron sitio de enzima de restricción y conector al fragmento. Se combinaron 100 ng de los fragmentos de V_H y V_L en una reacción en cadena de la polimerasa por corte y empalme por extensión por solapamiento (SOE-PCR) para la formación de scFv. El fragmento scFv se digirió con Nco I y Not I, y se subclonó en pCANTAB 5E digerido con las mismas enzimas para construir una biblioteca scFv.

TABLA 1

Biblioteca	Enfermedad	RIT usadas	Tamaño de biblioteca X10 ⁸ clones independientes	Tamaño de la biblioteca de fagos X10 ¹³ ufp/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
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 2

SEQ ID NO:	<i>Síntesis de ADNc de primera hebra</i>
	<i>Cebador de la región constante de la cadena pesada humana</i>
146	HuIgG1-4CH1FOR 5' GTC CAC CTT GGT GTT GCT GGG CTT 3'
	<i>Cebador de la región constante κ humana</i>
147	HuGκFOR 5' AGA CTC TCC CCT GTT GAA GCT CTT 3'
	PCR de primera etapa
	<i>Cebadores inversos V_H humanos</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>Cebadores inversos V_k humanos</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'
	PCR de segunda etapa
	<i>Cebadores Nco inversos V_H humanos</i>
160	<i>HuVH1aBACKnco</i> 5' GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GG 3'

SEQ ID NO:	Síntesis de ADNc de primera hebra
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'
Cebadores de conector directo J_H humanos	
166	conector <i>HuJH12FOR</i> 5' ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GCC 3'
167	conector <i>HuJH3FOR</i> 5' ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC 3'
168	conector <i>HuJH45FOR</i> 5' ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC 3'
169	conector <i>HuJH6FOR</i> 5' ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC 3'
Cebadores de conector directo V_k humanos	
170	conector <i>HuV_k 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	conector <i>HuV_k 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	conector <i>HuV_k 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	conector <i>HuV_k 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	conector <i>HuV_k 5aBACK</i> 5' GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC GAA ACG ACA CTC ACG CAG TCT CC 3'
175	conector <i>HuV_k 6aBACK</i> 5' GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC GAA ATT GTG CTG ACT CAG TCT CC 3'
Cebadores not directos J_k humanos	
176	<i>HuJ_k1BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT TTC CAC CTT GGT CCC 3'
177	<i>HuJ_k2BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAG CTT GGT CCC 3'
178	<i>HuJ_k3BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT ATC CAC TTT GGT CCC 3'
179	<i>HuJ_k4BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT GAT CTC CAC CTT GGT CCC 3'
180	<i>HuJ_k5BACKNot</i> 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC ACG TTT AAT CTC CAG TCG TGT CCC 3'
PCR de tercera etapa	
181	Conector R' 5' GCT TCC GCC ACC TCC AGA TCC GCC ACC ACC GGA TCC GCC TCC GCC 3'
182	Conector F' 5' GGC GGA GGC GGA TCC GGT GGT GGC GGA TCT GGA GGT GGC GGA AGC 3'
Preparación de fragmentos ScFv	
183	<i>VHlgGFOR</i> 5' GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC 3'

SEQ ID NO:	Síntesis de ADNc de primera hebra
184	VLREV 5' GAG TCA TTC TCG ACT TGC GGC CGC 3'

Se usó inmunotoxina biotinilada LMB-9 (B3-Fv-PE38) como antígeno para la selección de fago que expresa Fvs que se une a PE38. Cada molécula de LMB-9 contuvo 6 biotinas. Se obtuvieron 6 bibliotecas de anticuerpo humano por electroporaciones en TG1 de *Escherichia coli* (*E. coli*) que contenían $7,3 \times 10^7$ - $1,27 \times 10^8$ clones scFv VH-VL (Tabla 2). La biblioteca de fagos se rescató por superinfección con fago auxiliar (Tabla 2), y 350 ml de cada biblioteca obtuvieron aproximadamente 7×10^{12} fragmentos scFv presentados sobre la superficie de fago.

Se obtuvieron 710 clones de fago que contenían Fv y se secuenciaron. La secuenciación reveló que hubo 103 secuencias de cadena pesada humana y de cadena ligera kappa humana únicas presentes, excepto por 2 clones que tenían la misma secuencia de cadena ligera. Para mostrar que los Fvs se derivaron de linfocitos B que producen anticuerpos anti-inmunotoxina, se realizaron estudios de competición y mostraron que los antisueros inmunes bloquearon la unión del fago a la porción de PE 38 de LMB-9, y ninguno de los clones se unió a la porción Fv de la inmunotoxina. La intensidad de la unión se midió entonces usando un ICC-ELISA. 47 clones tuvieron unión débil y no se estudiaron adicionalmente. Los otros 56 clones se usaron para determinar los epítomos específicos de ser humano en PE38.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la localización de epítomos de 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 solo tenía el dominio III y carecía del dominio II. Quince de los 56 clones de fago no pudieron unirse a HA22-LR, que indica que los epítomos reconocidos por estos 15 clones de fago se localizaron en el dominio II. Se usaron los restantes 41 clones de fago para identificar los restos que constituyen los epítomos de linfocitos B en el dominio III midiendo su unión a 36 proteínas sustituidas en las que aminoácidos individuales en la superficie del dominio III de la proteína se cambiaron de un gran aminoácido voluminoso a alanina o glicina. Estas sustituciones eliminaron las grandes cadenas laterales voluminosas que participan en el reconocimiento y la unión de anticuerpos. Los datos se muestran en la Figura 1, donde clones con poca unión (<10 %) se muestran en celdas negras, y proteínas sustituidas con reactividad normal se muestran con celdas blancas. Los resultados muestran que una sola sustitución disminuyó la unión de muchos clones, así que indica que están en el mismo grupo de epítomos.

La localización de los restos que, cuando se sustituyeron, redujeron la unión de fago >90 % a los diversos epítomos se muestra en la Tabla 3. Los aminoácidos asociados a cada epítopo humano (H1, H2, H3, H4, H5 y H6) y de ratón (2c, 4a, 4b, 5, 6a, 6b y 7) se muestran en la Tabla 3. El epítopo humano H1 contuvo D403, E420, R427 y E431. R427 y E431 perteneció al epítopo de ratón 4a, y E420 al epítopo de ratón 7; estos 3 restos estuvieron implicados en tanto la unión al anticuerpo de ratón como humano. El epítopo humano H2 contuvo los restos R467 y D463, que pertenecieron al epítopo de ratón 2c, E548 que perteneció al epítopo de ratón 6a, y D581 perteneció al epítopo de ratón 6b. D461, Y481, L516, E522 y R551 fueron epítomos específicos de ser humano. El epítopo humano H3 solo contuvo R458 que perteneció al epítopo de ratón 4b. El epítopo humano H4 contuvo R432 y R505. R432 perteneció al epítopo de ratón 4a y R505 fue un resto específico de ser humano. El epítopo humano H5 estuvo compuesto de R490 y R576, que perteneció al epítopo de ratón 5. El epítopo humano H6 estuvo compuesto de R538 y R563. R538 pertenece al epítopo de ratón 2c y R563 al epítopo de ratón 4a. D406, R412, K606, R513, L597, Q592, D589 y K590 fueron epítomos específicos de ratón y no estuvieron implicados en la unión al epítopo humano.

TABLA 3

Epítomos humanos	
H1	D403, R427, E431, E420
H2	R551, D581, E548, L516, E522, D463, D461, Y481, R467
H3	R458
H4	R505, R432
H5	R490, R576
H6	R538, R563
Epítomos de ratón	
2c	D463, R467, R538
4a	R427, E431, R563, R432
4b	R406, R458
5	R412, R490, R576, K606
6a	L597, R513, E548
6b	Q592, D581
7	E420, K590, D589

Los clones de fago que reaccionan con el epítopo H1 estuvieron afectados por las sustituciones en el resto D403, E420, R427 o E431. Una sustitución de cualquiera de estos restos con alanina afectó enormemente la unión de muchos fagos que reconocieron el epítopo (Fig. 1). Como era de esperar para sustituciones que constituyen un

epítopo, estos restos estuvieron espacialmente adyacentes en el dominio III. El epítopo H2 era complejo. Los fagos que reaccionan con el epítopo H2 estuvieron afectados por las sustituciones en 8 restos. La sustitución de R467 con alanina destruyó la unión de seis de los ocho fagos que definieron el epítopo H2. La sustitución del resto D463 previno la unión de cuatro fagos, la sustitución Y481 o R551 previno la unión de tres fagos, la sustitución R551 previno la unión de dos fagos, y la sustitución de los restos D461, L516, E522, E548 o D581 previno la unión de un fago. Estructuralmente, estos restos residieron en un área restringida y constituyeron una agrupación. El epítopo H3 se definió por 2 fagos que se unen a R458. El epítopo H4 fue reconocido por 11 fagos y la unión fue destruida por una sustitución de R505A. Una sustitución en R432, que estaba próxima a R505, afectó la unión de 1 de los 11 fagos. El epítopo H5 se definió por la reactividad de 4 fagos. La unión a los cuatro estuvo afectada por una sustitución en R490 y una sustitución en R576 afectó la unión de tres de los cuatro fagos. Estos restos estuvieron espacialmente adyacentes en el dominio III, aún cuando estuvieron separados por 86 aminoácidos en la secuencia. Finalmente, el epítopo H6 se definió por la reactividad con 2 fagos. La sustitución en R563 afectó la unión de ambos fagos y una sustitución en R538 eliminó la unión de uno de los dos. En resumen, la sustitución de restos superficiales altamente expuestos con alanina identificó los restos que se unen a los fagos que se unen al dominio III, que muestra que los epítopos se localizaron en sitios distintos sobre la superficie del dominio III.

Ejemplo 3

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

Se usó la identificación de restos individuales que estuvieron implicados en la unión a antisueros humanos para diseñar y construir inmunotoxinas con sustituciones que eliminaron la reactividad con los antisueros humanos que todavía retenían la actividad citotóxica y podrían producirse en cantidades suficientes para ser útiles. En la mayoría de los casos, los restos fueron sustituidos con alanina, debido a que su cadena lateral pequeña reacciona poco con los anticuerpos y normalmente no afecta el plegamiento de proteínas. También se usó serina para evitar sustancialmente una superficie especialmente hidrófoba.

Basándose en la información en los estudios de mapeo de epítopos, se combinaron sustituciones seleccionadas de los diferentes aminoácidos que destruyeron la unión de Fvs humana al dominio III de HA22-LR. Las sustituciones se muestran en la Tabla 4 a continuación. LR05 tuvo todas las sustituciones presentes en HA22-LR-8M (406A, 432G, 467A, 490A, 513A, 548S, 590S, 592A) y 4 sustituciones nuevas, LR06 solo tuvo 2 sustituciones de HA22-LR-8M y 4 sustituciones nuevas, y LO10 fue como LR06 pero tuvo una sustitución 463A adicional (Tabla 5).

TABLA 4

LO5:	406A, 432G, 467A, 490A, 513A, 548S, 590S, 592A, 427A, 505A, 538A, 458A
LO6:	467A, 490A, 427A, 505A, 538A, 458A
LO10:	467A, 490A, 427A, 505A, 538A, 458A, 463A
LR-LO10R	467A, 490A, 427A, 505A, 538A, 463A

TABLA 5

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
LR-LO10R		X			X	X	X	X		X						5,8	141

Se expresaron y purificaron las proteínas sustituidas. El análisis en gel de SDS mostró que las proteínas sustituidas fueron más del 95 % homogéneas. Las proteínas purificadas se analizaron entonces para actividad citotóxica en varias líneas celulares CD22 positivas y para antigenicidad en términos de su capacidad para unirse a anticuerpos presentes en el suero de pacientes que había producido anticuerpos neutralizantes a inmunotoxinas que contienen PE38. Se analizaron 25 sueros de pacientes que habían recibido varias inmunotoxinas diferentes (LMB-9, SS1P y HA22).

Los datos en la Tabla 6 muestran que 3 inmunotoxinas nuevas fueron activas en líneas de linfoma CD22 positivas con una CI₅₀ de aproximadamente 1 ng/ml, pero menos activas que HA22-LR. La más activa fue HA22-LO10, que fue el 60 % tan activa como HA22-LR en células Daudi, 27 % tan activa en células Raji y el 29 % tan activa en células CA46. Estas nuevas inmunotoxinas fueron específicas de CD22 y no tuvieron actividad sobre las células A431 que no expresan CD22 (Tabla 6).

TABLA 6

	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 anticuerpos preexistentes. Para evaluar la antigenicidad de HA22-LO sustituido con sueros de paciente humano, se llevaron a cabo experimentos de competición en los que se midió la concentración de cada una de las inmunotoxinas sustituidas que redujo el nivel de anticuerpos que reaccionaban con HA22 el 50 %. Resultados de competición típicos con dos sueros de paciente se muestran en las Figuras 2A y 2B. La Figura 2A muestra que la concentración de HA22, HA22-LR, HA22-LO5, HA22-LO6, HA22-LR-8M y HA22-LO10 a la que se inhibió la unión a PE38 el 50 % (CI₅₀) fue 84,8, 38,1, 4580, 1440, 3610, >396000 nM, respectivamente. La relación de unión (CI₅₀) de HA22 a HA22-LR, HA22-LO5, HA22-LO6, HA22-LR-8M y HA22-LO10 fue 223, 1,85, 5,89, 2,35, y <0,0214 %, respectivamente. La Figura 2B muestra que la concentración de HA22, HA22-LR, HA22-LO5, HA22-LO6, HA22-LR-8M, y HA22-LO10 a la que se inhibió la unión a PE38 el 50 % (CI₅₀) fue 50,9, 67700, >396000, >396000, >396000, >396000 nM, respectivamente. La relación de unión (CI₅₀) de HA22 a HA22-LR, HA22-LO5, HA22-LO6, HA22-LR-8M y HA22-LO10 fue 0,752, <0,0129, <0,0129, <0,0129 y <0,4129 %.

En general, se analizaron sueros de 32 pacientes que se trataron durante más de 10 años con inmunotoxinas que contienen PE38 SS1P, HA22 y LMB9. Las relaciones de unión usando las inmunotoxinas sustituidas se muestran en la Tabla 7. Se encontró que la antigenicidad de HA22-LR-LO10 con sueros humanos fue sustancialmente reducida en comparación con HA22, HA22-LR y HA22-LR8M. La Figura 3 es un gráfico que muestra el porcentaje de unión de anticuerpos a HA22, HA22-LR-8M, HA22-LR-LO10 o HA22-LR-LO10R en los sueros de pacientes tratados usando PE38. HA22-LR-LO10R es similar a HA22-LO10, excepto que HA22-LR-LO10R carece de la sustitución de R458A que está presente en HA22-LO10 (Tablas 4 y 5). La Figura 3 muestra que veintitrés de treinta y dos pacientes demostraron unión (antigenicidad) que se redujo más de 100 veces (100 - 10000 veces). Solo en cuatro de los treinta y dos pacientes no pudo detectarse una disminución en la antigenicidad.

TABLA 7

Paciente	IT	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	IT	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

El uso de los términos "un", "una", "el" y "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) debe interpretarse que cubre tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto.

- 5 Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben ser interpretados como términos de extremos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a,"), a menos que se indique lo contrario. La cita de intervalos de valores en el presente documento está simplemente prevista para servir de un método clave para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se citara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o se contradiga de otro modo claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos, o lenguaje a modo de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento está previsto simplemente para iluminar mejor la invención y no plantea una limitación al alcance de la invención, a menos que se reivindique de otro modo. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como que indica cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <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 B MENOS INMUNOGÉNICOS
- 25 <130> 710974
- <150> US 61/535.668
- 30 <151> 16-09-2011
- <160> 188
- <170> PatentIn versión 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 613
- <212> PRT
- <213> *Pseudomonas aeruginosa*
- 40 <400> 1

ES 2 656 505 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

Leu Ala Arg Asp Ala Thr Phe Phe Val Arg Ala His Glu Ser Asn Glu
145 150 155 160

ES 2 656 505 T3

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

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

ES 2 656 505 T3

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
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintética
- 10 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(1)

ES 2 656 505 T3

<223> Xaa en la posición 1 es Leu, Ala, Gly, Ser o Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa en la posición 4 es Leu, Ala, Gly, Ser o Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa en la posición 5 es Tyr, Ala, Gly, Ser o Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa en la posición 6 es Leu, Ala, Gly, Ser o Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa en la posición 9 es Arg, Ala, Gly, Ser o Glu

<400> 2

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

25

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

<400> 3

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

35

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

40

<220>
 <223> Sintética

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

45

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

50

<400> 4

55

Arg Xaa Xaa Arg
1

<210> 5
 <211> 4

60

ES 2 656 505 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

<400> 5

Lys Asp Glu Leu
1

10 <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

5 <210> 10
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintética

10 <400> 10

Arg Lys Lys Arg
1

15 <210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<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
40 <213> Secuencia artificial

<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

ES 2 656 505 T3

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
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<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>

ES 2 656 505 T3

<223> Sintética

<400> 19

Arg Gln Pro Arg
1

5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

15

<400> 20

Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
1 5

20

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Sintética

<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

45

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Sintética

<400> 23

Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu
1 5

55

<210> 24

ES 2 656 505 T3

<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sintética

<400> 24

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

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

15 <220>
<223> Sintética

20 <400> 25

Arg Ser Lys Arg
1

25 <210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sintética

<400> 26

Arg His Arg Ser Lys Arg Gly Trp
1 5

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

40 <220>
<223> Sintética

<400> 27

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

50 <220>
<223> Sintética

55 <400> 28

ES 2 656 505 T3

Arg Ser Lys Arg Gly Trp Glu Gln Leu
1 5

5 <210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sintética

<400> 29

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

15 <210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Sintética

<400> 30

Arg His Arg Ser Lys Arg
1 5

25 <210> 31
<211> 15
<212> PRT
30 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 31

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

35 <210> 32
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
40 <400> 32

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

45 <210> 33
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
50 <400> 33

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

<210> 34

ES 2 656 505 T3

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

5 <400> 34

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

10 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

15 <400> 35

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

20 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 36

25 Leu Pro Leu Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp
 1 5 10 15

30 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 37

Glu Thr Phe Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu
 1 5 10 15

35 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

40 <400> 38

Thr Arg His Arg Gln Pro Arg Gly Trp Glu Gln Leu Glu Gln Cys
 1 5 10 15

45 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

50 <400> 39

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

<210> 40

ES 2 656 505 T3

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

5 <400> 40

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

<210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10

<400> 41

15

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

<210> 42
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

20

<400> 42

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

25

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

30

<400> 43

Gly Tyr Pro Val Gln Arg Leu Val Ala Leu Tyr Leu Ala Ala Arg

35

1 5 10 15

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

40

<400> 44

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

45

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

50

<400> 45

ES 2 656 505 T3

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

5 <210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 46

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

10 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 15 <400> 47

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

20 <210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 25 <400> 48

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

30 <210> 49
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 35 <400> 49

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

40 <210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 45 <400> 50

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

50 <210> 51
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 51

ES 2 656 505 T3

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

5 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 52

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

10 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 53

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

20 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 54

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

30 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 35 <400> 55

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

40 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*
 45 <400> 56

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

50 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 656 505 T3

<400> 57

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

<210> 58

5 <211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 58

10

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

<210> 59

15 <211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 59

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

20

<210> 60

25 <211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 60

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

30

<210> 61

35 <211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 61

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

40

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

45

<400> 62

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

50

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> *Pseudomonas aeruginosa*

ES 2 656 505 T3

<400> 63

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

5

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

10

<400> 64

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

15

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

20

<400> 65

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

25

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

30

<400> 66

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

35

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

<400> 67

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

40

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

45

<400> 68

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

50

<210> 69

ES 2 656 505 T3

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

5 <400> 69

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

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

10

<400> 70

15

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

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

20

<400> 71

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

25

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

30

<400> 72

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

35

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

40

<400> 73

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

45

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

50

<400> 74

ES 2 656 505 T3

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

<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

10 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

15 <400> 76

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

20 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

25 <400> 77

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

30 <210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

35 <400> 78

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

40 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 79

Arg Gly Thr Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His
 1 5 10 15

45 <210> 80
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

50 <400> 80

ES 2 656 505 T3

Gln Asn Trp Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu
 1 5 10 15

5 <210> 81
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

10 <400> 81

Thr Val Glu Arg Leu Leu Gln Ala His Arg Gln Leu Glu Glu Arg
 1 5 10 15

15 <210> 82
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 82

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

20 <210> 83
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 83

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

30 <210> 84
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

35 <400> 84

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

40 <210> 85
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

45 <400> 85

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

50 <210> 86
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 656 505 T3

<213> *Pseudomonas aeruginosa*
<400> 86

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

5

<210> 87
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

10

<400> 87

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

15

<210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

20

<400> 88

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

25

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

30

<400> 89

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

35

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

<400> 90

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

40

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

45

<400> 91

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

50

<210> 92
<211> 15
<212> PRT

ES 2 656 505 T3

<213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 92

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

5

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

10

<400> 93

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

15

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

20

<400> 94

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

25

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

30

<400> 95

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

35

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

<400> 96

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

40

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

45

<400> 97

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

50

<210> 98
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 656 505 T3

<213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 98

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

5

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

10

<400> 99

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

15

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

20

<400> 100

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

25

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

30

<400> 101

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

35

<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

40

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

45

<400> 103

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

50

<210> 104
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 656 505 T3

<213> *Pseudomonas aeruginosa*
 <400> 104

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

5

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

10

<400> 105

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

15

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

20

<400> 106

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

25

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

30

<400> 107

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

35

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

40

<400> 108

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

45

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

50

<400> 109

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

<210> 110
 <211> 15

ES 2 656 505 T3

<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 110

5

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

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

10

<400> 111

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

15

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

20

<400> 112

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

25

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

30

<400> 113

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

35

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

40

<400> 114

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

45

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

50

<400> 115

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

<210> 116

ES 2 656 505 T3

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

5 <400> 116

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

10 <210> 117
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

15 <400> 117

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

20 <210> 118
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 118

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

30 <210> 119
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 119

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

35 <210> 120
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

40 <400> 120

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

45 <210> 121
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Pseudomonas aeruginosa*

50 <400> 121

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

ES 2 656 505 T3

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

5
<400> 122

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

10
<210> 123
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

15
<400> 123

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

20
<210> 124
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

25
<400> 124

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

30
<210> 125
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 125

35
Gly Arg Leu Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr
1 5 10 15

40
<210> 126
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 126

45
Glu Thr Ile Leu Gly Trp Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile
1 5 10 15

50
<210> 127
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*

<400> 127

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

ES 2 656 505 T3

<210> 128
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
5
<400> 128
Pro Leu Ala Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr
1 5 10 15
10 <210> 129
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
15 <400> 129
Glu Arg Thr Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg
1 5 10 15
20 <210> 130
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
25 <400> 130
Val Val Ile Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly
1 5 10 15
30 <210> 131
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
35 <400> 131
Pro Ser Ala Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu
1 5 10 15
40 <210> 132
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
45 <400> 132
Ile Pro Thr Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser
1 5 10 15
50 <210> 133
<211> 15
<212> PRT
<213> *Pseudomonas aeruginosa*
55 <400> 133
Asp Pro Arg Asn Val Gly Gly Asp Leu Asp Pro Ser Ser Ile Pro
1 5 10 15
55 <210> 134

ES 2 656 505 T3

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

5 <400> 134

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

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

10

<400> 135

15

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

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

20

<400> 136

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

25

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

30

<400> 137

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

35

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

40

<400> 138

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

45

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

50

<400> 139

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

ES 2 656 505 T3

<221> MISC_FEATURE

<222> (198)..(198)

<223> Xaa en la posición 198 es Ala, Gly, Ser o Gln

5 <400> 142

```

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

5

<220>
<223> Sintética

10

<400> 143

ES 2 656 505 T3

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

<210> 144
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Sintética

<400> 144

ES 2 656 505 T3

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

ES 2 656 505 T3

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

25 <400> 146
 gtccaccttg gtgtgctgg gctt 24

30 <210> 147
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintética

35 <400> 147
 agactctccc ctgtgaagc tctt 24

<210> 148

ES 2 656 505 T3

	<211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sintética	
10	<400> 148 caggtgcagc tggcagtc tgg	23
15	<210> 149 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 149 caggtcaact taaggagtc tgg	23
30	<210> 150 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
40	<400> 150 gaggtgcagc tggggagtc tgg	23
45	<210> 151 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 151 caggtgcagc tgcaggagtc ggg	23
60	<210> 152 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintética	
70	<400> 152 gaggtgcagc tgtgcagtc tgc	23
75	<210> 153 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
80	<220> <223> Sintética	
85	<400> 153 caggtacagc tgcagcagtc agg	23
90	<210> 154	

ES 2 656 505 T3

	<211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sintética	
10	<400> 154 gacatccaga tgaccagtc tec	23
15	<210> 155 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 155 gatgtgtga tgactcagtc tec	23
30	<210> 156 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
40	<400> 156 gaaattgtgt tgacgcagtc tec	23
45	<210> 157 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 157 gacatcgta tgaccagtc tec	23
60	<210> 158 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintética	
	<400> 158 gaaacgacac tcacgcagtc tec	23
	<210> 159 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Sintética	
	<400> 159 gaaattgtgc tgactcagtc tec	23
	<210> 160	

ES 2 656 505 T3

	<211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sintética	
10	<400> 160 gcccagccgg ccatggccca ggtgcagctg gtcagctcg g	41
15	<210> 161 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 161 gcccagccgg ccatggccca ggtcaactta agggagtctg g	41
30	<210> 162 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
40	<400> 162 gcccagccgg ccatggccga ggtgcagctg gtggagtctg g	41
45	<210> 163 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 163 cccagccggc catggcccag gtcagctgc aggagtccgg	40
60	<210> 164 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintética	
70	<400> 164 gcccagccgg ccatggccga ggtgcagctg ttgcagctcg c	41
75	<210> 165 <211> 41 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
80	<220> <223> Sintética	
85	<400> 165 gcccagccgg ccatggccca ggtacagctg cagcagtcag g	41
90	<210> 166	

ES 2 656 505 T3

	<211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sintética	
10	<400> 166 acctccagat cgccaccac cggatccgcc tccgcctgag gagacggtga ccagggtgcc	60
15	<210> 167 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 167 acctccagat cgccaccac cggatccgcc tccgcctgaa gagacggtga ccattgtccc	60
30	<210> 168 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
40	<400> 168 acctccagat cgccaccac cggatccgcc tccgcctgag gagacggtga ccagggttcc	60
45	<210> 169 <211> 60 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 169 acctccagat cgccaccac cggatccgcc tccgcctgag gagacggtga ccgtgttccc	60
60	<210> 170 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintética	
70	<400> 170 ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaca tccagatgac ccagtctcc	59
75	<210> 171 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
80	<220> <223> Sintética	
85	<400> 171 ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgatg ttgtgatgac tcagtctcc	59
90	<210> 172	

ES 2 656 505 T3

	<211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sintética	
10	<400> 172 ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaaa ttgtgtgac gcagtctcc	59
15	<210> 173 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintética	
25	<400> 173 ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaca tcgtgatgac ccagtctcc	59
30	<210> 174 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
40	<400> 174 ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaaa cgacactcac gcagtctcc	59
45	<210> 175 <211> 59 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Sintética	
55	<400> 175 ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagcgaaa ttgtgctgac tcagtctcc	59
60	<210> 176 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Sintética	
70	<400> 176 gagtcattct cgactgCGG cgcacgTTT gattccacc ttgtccc	48
75	<210> 177 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
80	<220> <223> Sintética	
85	<400> 177 gagtcattct cgactgCGG cgcacgTTT gatctccagc ttgtccc	48
90	<210> 178	

ES 2 656 505 T3

	<211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sintética	
	<400> 178 gagtcattct cgactgCGG cgcacgTtT gatatccact ttgtccc	48
10	<210> 179 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Sintética	
	<400> 179 gagtcattct cgactgCGG cgcacgTtT gatctccacc ttgtccc	48
20	<210> 180 <211> 48 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Sintética	
	<400> 180 gagtcattct cgactgCGG cgcacgTtT aatctccagt cgtgtccc	48
30	<210> 181 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sintética	
	<400> 181 gctccgcca cctccagatc cgccaccacc ggatccgcct cgcgc	45
40	<210> 182 <211> 45 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintética	
	<400> 182 ggcggaggcg gatccggtgg tggcggatct ggaggtggcg gaagc	45
50	<210> 183 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Sintética	
	<400> 183 gtcctcgcaa ctgCGGCCA gccggccatg gcc	33
60	<210> 184	
65		

ES 2 656 505 T3

	<p><211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
5	<p><220> <223> Sintética</p>	
10	<p><400> 184 gagtcattct cgactgcgg ccgc</p>	24
15	<p><210> 185 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
20	<p><220> <223> Sintética</p> <p><400> 185 gcccagccgg ccatggcc</p>	18
25	<p><210> 186 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
30	<p><220> <223> Sintética</p> <p><400> 186 acctccagat ccgccaccac cggatccgcc tccgcc</p>	36
35	<p><210> 187 <211> 36 <212> ADN <213> Secuencia artificial</p>	
40	<p><220> <223> Sintética</p> <p><400> 187 ggatccggtg gtggcggatc tggaggtggc ggaagc</p>	36
45	<p><210> 188 <211> 219 <212> PRT <213> Secuencia artificial</p>	
50	<p><220> <223> Sintética</p>	
55	<p><220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(219) <223> con la condición de que SEQ ID NO: 188 no comprenda los restos de aminoácidos 395-613 de SEQ ID NO: 1</p>	
60	<p><220> <221> MISC_FEATURE <222> (26)..(26) <223> X en 26 es Ala, Gly, Ser, Gln o Glu</p>	
65	<p><220> <221> MISC_FEATURE <222> (69)..(69) <223> X en 69 es Ala, Gly, Ser, Gln o Asp</p>	

ES 2 656 505 T3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (87)..(87)
 <223> X en 87 es Ala, Gly, Ser, Gln o Tyr
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (122)..(122)
 <223> X en 122 es Gly, Ser, Gln o Leu
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (169)..(169)
 <223> X en 169 es Ala, Gly, Ser, Gln o Arg
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (187)..(187)
 <223> X at 187 es Ala, Gly, Ser, Gln o Asp
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (195)..(195)
 <223> X at 195 es Ala, Gly, Ser, Gln o Asp
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (212)..(212)
 <223> X en 212 es Ala, Gly, Ser, Gln o Lys
 30
 <400> 188

Pro	Thr	Gly	Ala	Glu	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Gly	Asp	Val	Ser	Phe	Ser
1				5					10					15	
Thr	Arg	Gly	Thr	Gln	Asn	Trp	Thr	Val	Xaa	Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	His
			20					25					30		
Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Arg	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	Xaa	Ala	Ile	Trp	Arg	Gly	Phe	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asp
65					70					75					80
Pro	Ala	Leu	Ala	Tyr	Gly	Xaa	Ala	Gln	Asp	Gln	Glu	Pro	Asp	Ala	Arg
				85					90					95	
Gly	Arg	Ile	Arg	Asn	Gly	Ala	Leu	Leu	Arg	Val	Tyr	Val	Pro	Arg	Ser
			100					105						110	

ES 2 656 505 T3

Ser Leu Pro Gly Phe Tyr Arg Thr Ser Xaa 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 Glu Gly Gly Arg Leu Glu Thr
145 150 155 160

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Una exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) que comprende una secuencia de aminoácidos de PE, en la que el resto de aminoácido D463, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1, está sustituido, en la que la PE tiene actividad citotóxica y es menos inmunogénica que PE sin sustituir, en la que
- 5 (i) la PE tiene sustituciones adicionales de los restos de aminoácidos R427, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1, o
- 10 (ii) la PE tiene sustituciones adicionales de los restos de aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.
2. La PE de la reivindicación 1, en la que la PE tiene una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T y/o una delección de uno o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 1-273 y 285-394 como se define por SEQ ID NO: 1.
- 15 3. La PE de la reivindicación 2, en la que la PE tiene la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T, y la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T es una sustitución, independientemente, por alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299, R302, y los restos de aminoácidos en las posiciones 464-480, 482-515 y 517-519 como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.
- 20 4. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la sustitución adicional en (i) o (ii) del resto de aminoácido R490 es una sustitución por valina, leucina o isoleucina en lugar del resto de aminoácido R490, en la que el resto de aminoácido R490 se define por referencia a SEQ ID NO: 1.
- 25 5. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la sustitución de D463 es una sustitución por alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de resto del aminoácido D463.
- 30 6. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la sustitución adicional en (i) o (ii) es una sustitución, independientemente, por alanina, glicina, serina, o glutamina en lugar de uno o más de los restos de aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.
- 35 7. La PE de la reivindicación 6, en la que la sustitución adicional en (i) o (ii) es una sustitución, independientemente, por alanina, glicina, o serina en lugar de uno o más de los restos de aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505 y R538.
- 40 8. La PE de la reivindicación 7, en la que la sustitución del resto de aminoácido D463 es una sustitución por alanina en lugar del resto de aminoácido D463, y la sustitución adicional es:
- 45 (a) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R427;
 (b) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R458;
 (c) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R467;
 (d) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R490;
 (e) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R505; y
 (f) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R538,
- como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.
- 50 9. Una PE que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la Fórmula I:
- en la que:
- $$\text{FCS} - \text{R}^1_{\text{m}} - \text{R}^2_{\text{p}} - \text{R}^3_{\text{n}} - \text{dominio III funcional de PE} \quad (\text{Fórmula I})$$
- 55 m, n y p son, independientemente, 0 o 1;
 FCS comprende una secuencia de escisión por furina de restos de aminoácidos, secuencia que es escindible por furina;
 R^1 comprende 1 a 10 restos de aminoácidos;
 R^2 comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 285-364 de SEQ ID NO: 1;
 R^3 comprende 1 o más restos de aminoácidos contiguos de los restos 365-394 de SEQ ID NO: 1; y
- 60 el dominio III funcional de PE comprende los restos 395-613 de SEQ ID NO: 1 que tienen una sustitución de resto de aminoácido D463 como se define por referencia a SEQ ID NO: 1, en la que la PE tiene actividad citotóxica y es menos inmunogénica que PE sin sustituir, en la que
- 65 (i) la PE tiene sustituciones adicionales de los restos de aminoácidos R427, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1, o

(ii) la PE tiene sustituciones adicionales de los restos de aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505 y R538, como se define por referencia a SEQ ID NO: 1.

5 10. La PE de la reivindicación 9, en la que la sustitución adicional en (i) o (ii) es una sustitución, independientemente, por alanina, glicina, serina o glutamina de uno o más de los restos de aminoácidos R427, R458, R467, R490, R505 y R538 de SEQ ID NO: 1 y/o una sustitución por valina, leucina o isoleucina en lugar del resto de aminoácido R490 de SEQ ID NO: 1.

10 11. La PE de la reivindicación 9 o 10, en la que FCS comprende los restos 274-284 de SEQ ID NO: 1.

12. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en la que la PE tiene una sustitución adicional de uno o más restos de aminoácidos dentro de uno o más epítomos de linfocitos T.

15 13. La PE de la reivindicación 12, en la que la PE tiene la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T, y la sustitución adicional de un aminoácido dentro de uno o más epítomos de linfocitos T es una sustitución, independientemente, por alanina, glicina, serina o glutamina en lugar de uno o más de los restos de aminoácidos L294, L297, Y298, L299, R302, y restos de aminoácidos en las posiciones 464-480, 482-515 y 517-519 de SEQ ID NO: 1.

20 14. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en la que p es 1.

15. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, en la que la sustitución del resto de aminoácido D463 es una sustitución por alanina, glicina, serina o glutamina en lugar del resto de aminoácido D463.

25 16. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15, en la que

m, n, y p son cada uno 0;

FCS comprende los restos 274-284 de SEQ ID NO: 1; y

30 la sustitución de resto de aminoácido D463 es una sustitución por alanina en lugar del resto de aminoácido D463 y la sustitución adicional es:

(a) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R427;

(b) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R458;

35 (c) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R467;

(d) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R490;

(e) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R505; y

(f) una sustitución por alanina del resto de aminoácido R538.

40 17. Una molécula quimérica que comprende (a) un resto de direccionamiento conjugado o fusionado con (b) la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, preferentemente en la que el resto de direccionamiento es cualquiera de:

45 (1) un anticuerpo monoclonal, preferentemente en la que el anticuerpo monoclonal se une específicamente a un marcador de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y, o

(2) la porción de unión al antígeno de la inmunotoxina HA22.

50 18. La molécula quimérica de la reivindicación 17, en la que el resto de direccionamiento es cualquiera de (1) un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión al antígeno del mismo, en la que el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador de superficie celular Lewis Y es B3, en la que el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador de superficie celular CD22 es RFB4, en la que el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador de superficie celular mesotelina está seleccionado del grupo que consiste en SS, SS1, MN, MB, HN1, HN2, MORAb-009, en la que el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador de superficie celular receptor de transferrina es HB21; o (2) la porción de unión al antígeno de la inmunotoxina HA22.

55 19. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o la molécula quimérica de la reivindicación 17 o 18.

60 20. Un vector de expresión recombinante que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 19.

21. Una célula hospedadora que comprende el vector de expresión recombinante de la reivindicación 20, en la que la célula hospedadora no es una célula germinativa humana.

65 22. Una población aislada de células que comprende al menos una célula hospedadora de la reivindicación 21.

23. Una composición farmacéutica que comprende (a) la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, la

molécula quimérica de la reivindicación 17 o 18, el ácido nucleico de la reivindicación 19, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 20, la célula hospedadora de la reivindicación 21, o la población de células de la reivindicación 22, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 24. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, la molécula quimérica de la reivindicación 17 o 18, el ácido nucleico de la reivindicación 19, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 20, la célula hospedadora de la reivindicación 21, la población de células de la reivindicación 22, o la composición farmacéutica de la reivindicación 23, para su uso en inhibir el crecimiento de una célula diana, preferentemente en la que la célula diana:

10 (a) es una célula cancerosa, o
(b) expresa un marcador de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y.

15 25. Un método de producción de una PE que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para proporcionar la PE y (b) purificar la PE.

20 26. Un método de producción de una molécula quimérica que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula quimérica de la reivindicación 17 o 18 para proporcionar la molécula quimérica y (b) purificar la molécula quimérica.

25 27. Un método de producción de una molécula quimérica que comprende (a) expresar recombinantemente una secuencia de nucleótidos que codifica la PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para proporcionar la PE, (b) purificar la PE, y (c) unir covalentemente un resto de direccionamiento a la PE purificada, preferentemente en el que el resto de direccionamiento es cualquiera de:

30 (1) un anticuerpo monoclonal, preferentemente en el que el anticuerpo monoclonal se une específicamente a un marcador de superficie celular seleccionado del grupo que consiste en CD19, CD21, CD22, CD25, CD30, CD33, CD79b, receptor de transferrina, receptor de EGF, mesotelina, cadherina y Lewis Y, o
(2) la porción de unión al antígeno de la inmunotoxina HA22.

35 28. El método de la reivindicación 27, en el que el resto de direccionamiento es cualquiera de (1) un anticuerpo monoclonal, o una porción de unión al antígeno del mismo, en el que el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador de superficie celular Lewis Y es B3, en el que el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador de superficie celular CD22 es RFB4, en el que el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador de superficie celular mesotelina está seleccionado del grupo que consiste en SS, SS1, MN, MB, HN1, HN2, MORAb-009, o en el que el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al marcador de superficie celular receptor de transferrina es HB21; o (2) la porción de unión al antígeno de la inmunotoxina HA22.

40 29. La PE de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, la molécula quimérica de la reivindicación 17 o 18, el ácido nucleico de la reivindicación 19, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 20, la célula hospedadora de la reivindicación 21, la población de células de la reivindicación 22, o la composición farmacéutica de la reivindicación 23, para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer en un mamífero.

45

FIG. 1

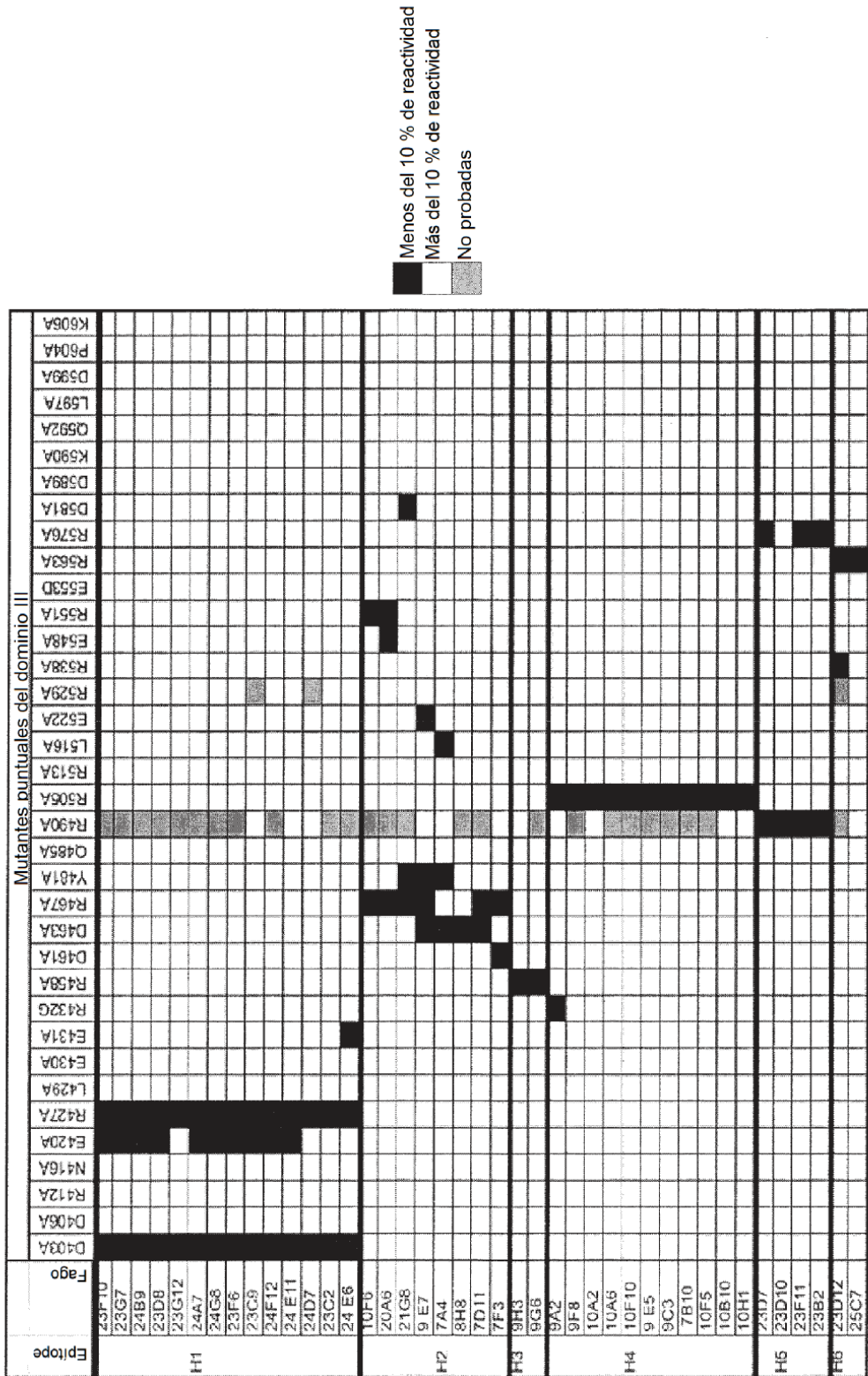


FIG. 2A

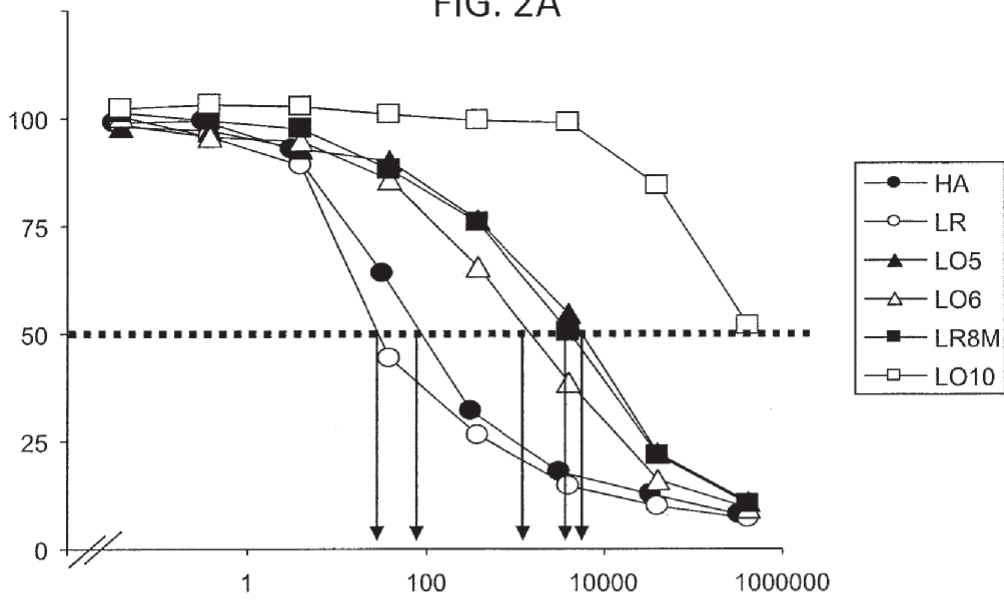


FIG. 2B

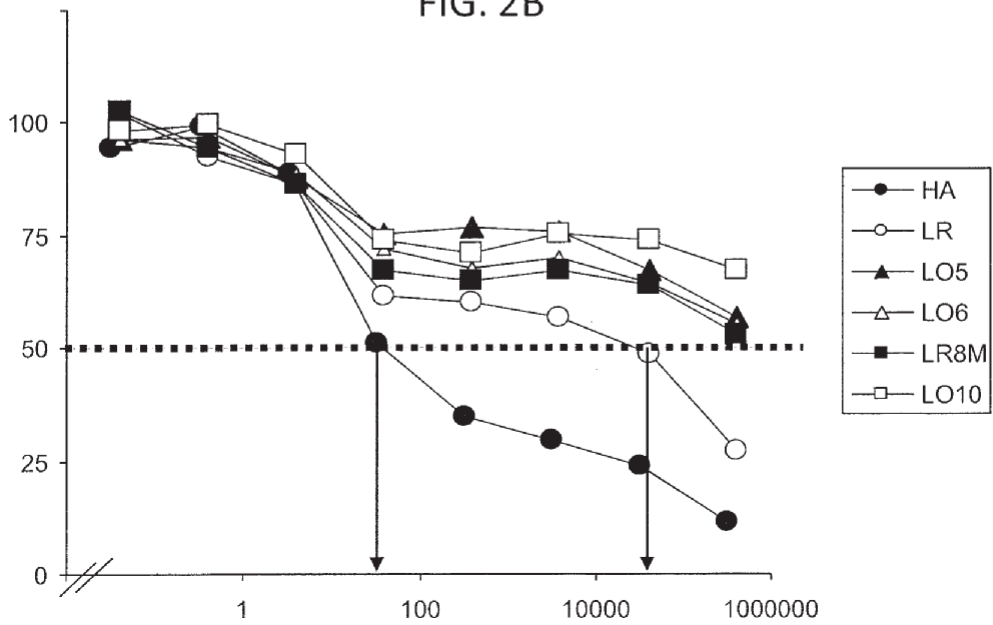


FIG. 3

