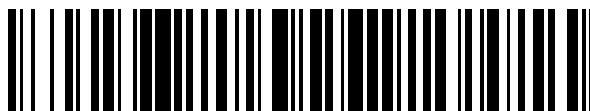


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 168**

51 Int. Cl.:

C07K 14/34 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2013 PCT/IB2013/052173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013 WO13140335**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2013 E 13720081 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2828285**

54 Título: **Inhibidor del HB-EGF derivado del dominio R de la toxina diftérica para el tratamiento de enfermedades asociadas a la activación de la ruta HB-EGF/EGFR**

30 Prioridad:

20.03.2012 FR 1252497

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

22.08.2018

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
25, Rue Leblanc, Bâtiment "Le Ponant D"
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**GILLET, DANIEL;
VILLIERS, BENOIT;
PICHARD, SYLVAIN;
MAILLÈRE, BERNARD y
SANSON, ALAIN**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 679 168 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

Inhibidor del HB-EGF derivado del dominio R de la toxina diftérica para el tratamiento de enfermedades asociadas a la activación de la ruta HB-EGF/EGFR

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a una proteína recombinante ligando inhibidora del HB-EGF (análogo del factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, por sus siglas en inglés), obtenida a partir del dominio R de la toxina diftérica, de utilidad para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades que implican la activación de la ruta HB-EGF/EGFR.

Estado de la técnica

El HB-EGF es un factor de crecimiento expresado en la superficie de las células del organismo en forma de una proteína de membrana precursora, el pro-HB-EGF, que es el receptor natural de la toxina diftérica.

La toxina diftérica (DT) es una exotoxina de 535 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) compuesta por un fragmento A (extremo N) y un fragmento B (extremo C). El fragmento A comprende el dominio catalítico (C o DTA/DT-A; restos 1 a 193) y el fragmento B comprende el dominio de translocación (T; extremo N; restos 202 a 378), y el dominio de unión al receptor celular (R o DTR; extremo C; restos 379-386 a 535). La DT se fija a la superficie de las células mediante la unión de su dominio R a la pro-HB-EGF; tras la activación de la DT por escisión proteolítica entre los fragmentos A y B, el dominio T permite la translocación del fragmento A al interior del citoplasma. Una vez dentro del citoplasma, el dominio catalítico que transporta el fragmento A bloquea la síntesis proteica, inactivando el factor de alargamiento EF2, produciendo de esta forma la muerte de las células. El estudio de mutantes naturales o sintéticos de DT ha mostrado que la unión de la DT al receptor pro-HB-EGF se anula mediante la sustitución del resto S508 (S508F) o de los restos del bucle de la región K516-F530 de DTR (K516A, K516E, F530A, F530S y S525F) pero no por la delección de los 4 restos del extremo C (restos E532-S535; Shen et al., J. Biol. Chem., 1994, 269, 29077-29084). Además, el mutante natural de la DT que comprende la mutación G52E, denominado CRM197, tiene una actividad catalítica muy disminuida (Giannini et al., N.A.R., 1984, 12, 4063-4069).

En los procesos inflamatorios que implican HB-EGF, la proteína de la membrana pro-HB-EGF se escinde mediante una proteasa y el HB-EGF se libera de la superficie celular, en forma de una proteína secretada. A continuación, se une de forma autocrina o paracrina según los subtipos ErbB1 (HER1 o EGFR) y ErbB4 (HER4) de la familia de los receptores de EGF (familia EGFR o EGFR), expresados en la práctica totalidad de los tejidos del organismo. Existen al menos diez ligandos del EGFR además del HB-EGF, es decir EGF, TGF-alfa, anfirregulina, betacelulina, epígeno, epirregulina y las neurregulinas 1, 2, 3 y 4. Es el contexto local el que determina su estimulación por uno u otro de estos ligandos.

La activación de la ruta HB-EGF/EGFR que está asociada a un aumento en la expresión de pro-HB-EGF y/o a la liberación de HB-EGF, conlleva una proliferación celular perjudicial responsable de numerosas patologías:

- glomerulonefritis de rápida progresión (GNRP) durante las cuales, la proliferación de células renales glomerulares (podocitos) da como resultado la destrucción del riñón (Feng et al., J. Clin. Invest., 2000, 105, 341-350; Bollee et al., Nat. Med., 2011, 17, 1242-1250),
- cánceres, incluidos el cáncer de ovario, del endometrio, de mama, del útero (adenocarcinoma uterino), de la vesícula, de estómago, de la piel (melanoma maligno), de cerebro (glioblastoma) y de pulmón (Yotsumoto et al., Biochem Biophys Res Commun, 2008, 365, 555-561; Miyamoto et al., Adv. Exp. Med. Biol., 2008, 622, 281-295; Miyamoto et al., Anticancer Res., 2009, 29, 823-830; Fu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1999, 96, 5716-5721; Tsujioka et al., Anticancer. Res., 2010, 30, 3107-3112),
- vasoespasmos asociados a contusiones cerebrales (Chansel et al., FASEB J., 2006, 20, 1936-1938),
- hipertrofia cardíaca (Asakura et al., Nat. Med., 2002, 8, 35-40; Hamaoka et al., J. Biochem., 2010, 148, 55-69),
- hiperplasia de las células de la musculatura lisa (Miyagawa et al., J. Clin. Invest., 1995, 95, 404-411; Hamaoka et al., J. Biochem., 2010, 148, 55-69),
- hipertensión pulmonar (Powell et al., Am. J. Pathol., 1993, 143, 784-793; Hamaoka et al., J. Biochem., 2010, 148, 55-69),
- retinopatías diabéticas, y
- estenosis arterial.

Debido a su implicación en un número creciente de enfermedades, HB-EGF representa una diana terapéutica. En la actualidad existen dos tipos de moléculas disponibles para bloquear la acción del HB-EGF sobre el EGFR, los inhibidores del EGFR y los inhibidores del HB-EGF. Sin embargo, estas moléculas potencialmente útiles para tratar patologías que implican una activación del EGFR mediante el HB-EGF (ruta HB-EGF/EGFR) tienen algunos inconvenientes importantes.

Inhibidores del EGFR

Teóricamente se podrían utilizar dos inhibidores del EGFR para bloquear la estimulación del EGFR por el HB-EGF: los inhibidores de las tirosina quinasas reversibles que actúan sobre el EGFR, como erlotinib, y los anticuerpos contra el EGFR, como cetuximab (Ciardiello y Tortora, N. Engl. J. Med., 358, 1160-1174; documento WO 2008/053270).

No obstante, estas moléculas que actúan sobre la tirosina-quinasa del EGFR (moléculas pequeñas) o sobre el propio EGFR (anticuerpos monoclonales) no son específicas de la ruta HB-EGF/EGFR, dado que bloquean la activación del EGFR independientemente del origen del estímulo, independientemente del ligando activador y de lo que sea dicho ligando. Debido a su falta de especificidad, los inhibidores del EGFR producen efectos secundarios significativos. Como ejemplo, se pueden citar los siguientes efectos adversos comunicados, respectivamente para erlotinib y cetuximab: neutropenia, trombocitopenia, anemia, edemas, náuseas, vómitos, cefaleas, prurito y dolores musculoesqueléticos; fiebre, escalofríos, urticaria, pruritos, erupción cutánea, hipotensión, broncoespasmo, disnea, edemas, confusión, choque anafiláctico y parada cardíaca.

Además, los anticuerpos tienen un tamaño demasiado grande (150 kDa) para llegar a su diana en el caso de la GNRP, dado que el EGFR estimulado por el HB-EGF se expresa en los podocitos de los glomérulos renales, y el umbral de filtración glomerular es de aproximadamente 68 kDa. Análogamente, la penetración de los anticuerpos en tumores sólidos está limitada en razón de su tamaño.

Inhibidores del HB-EGF

En ratones, la invalidación del gen de pro-HB-EGF impide la activación de una GNRP provocada (Bollee et al., Nat. Med., 2011, 17, 1242-1250), justificando así el interés por desarrollar un ligando inhibidor del HB-EGF y de pro-HB-EGF para el tratamiento de patologías que implican la activación de la ruta HB-EGF/EGFR.

En la actualidad existen dos tipos de inhibidores de HB-EGF, potencialmente útiles para bloquear la estimulación del EGFR por el HB-EGF: los anticuerpos contra el HB-EGF (documentos WO 2009/040134; WO 2011/21381; WO 2009/72628; EP 2221374; EP 2281001; EP 2093237; EP 2078731; EP 2039704; WO 2008/053270) y CRM197 (documentos US 7,700,546; US 2006/0270600; EP 1894575).

Los anticuerpos dirigidos contra el HB-EGF son más específicos que los inhibidores del EGFR, puesto que bloquean exclusivamente la activación de la ruta HB-EGF/EGFR pero tienen los mismos inconvenientes que los anticuerpos anti-EGFR, vinculados a su tamaño demasiado grande.

CRM197 es un ligando natural del HB-EGF capaz de bloquear su unión al EGFR. En la actualidad se utiliza en ensayos clínicos para bloquear el HB-EGF con el objetivo de combatir el cáncer de ovario (Koshikawa et al., Cancer Sci., 2011, 102, 111-116; Tsuchioka et al., Anticancer Res., 2011, 31, 2461-2465).

No obstante, CRM197 tiene los inconvenientes de toxicidad residual, de tamaño, de afinidad, de inmunogenicidad y antigenicidad.

La toxicidad residual de CRM197 es 10^6 veces menor que la de la toxina diftérica natural (Kageyama et al., J. Biochem., 2007, 142, 95-104). Sin embargo, esta no es despreciable porque la toxina natural es muy potente, con una dosis letal 50 (DL50) de 5 pM en cultivo de células de primate. Por tanto, CRM197 es tóxica a dosis micromolares (μ M). Esto puede suponer un riesgo si se administra al ser humano a dosis elevada (Kageyama et al., J. Biochem., 2007, 142, 95-104).

CRM197 tiene una masa molecular de 58 Da, por lo que atraviesa con dificultad el umbral de filtración glomerular. Por tanto, no se puede utilizar para tratar las GNRP u otras patologías tales como los tumores sólidos, donde la penetración tisular es un factor importante para la eficacia terapéutica.

CRM197 tiene una afinidad media por HB-EGF ($K_d = 27$ nM; Brooke et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 248, 297-302). Esta afinidad es menor que la de un buen anticuerpo terapéutico.

CRM197 es muy inmunógena. Se diferencia de la toxina diftérica solamente en un resto (G52E). Por tanto, contiene la totalidad de los epítomos T CD4 de la toxina diftérica, o casi todos, si la mutación afecta a un epítomo T. O bien, las poblaciones occidentales están vacunadas contra la toxina diftérica. Tratar los pacientes con CRM197 es equivalente a una vacunación de recuerdo. Desde la primera inyección, CRM197 puede conllevar la reactivación de los linfocitos T CD4 de memoria y reestimar la producción de anticuerpos en circulación. Varios días después de la primera administración de CRM197, estos anticuerpos deberían neutralizar la proteína y convertir el tratamiento en ineficaz.

CRM197 es muy antigénica porque tiene prácticamente todos los epítomos B de la toxina diftérica. Puesto que la población occidental está vacunada contra la toxina diftérica, una fracción significativa de los individuos tiene anticuerpos circulantes capaces de neutralizar CRM197 desde la primera administración. Esto obliga a utilizar dosis masivas de CRM197 para obtener un efecto terapéutico, lo que aumenta considerablemente los riesgos de efectos secundarios (toxicidad, choque anafiláctico, etc.).

En consecuencia, existe una necesidad real de disponer de inhibidores novedosos del HB-EGF que tengan un tamaño más pequeño, una mayor afinidad por el HB-EGF, una antigenicidad, una inmunogenicidad y toxicidad reducidas, en comparación con CRM197.

5 Hasta el momento, no ha sido posible producir el dominio DTR aislado, directamente, en forma recombinante, con rendimiento elevado, y sin utilizar detergentes o agentes caotrópicos o desnaturalizantes para extraer la proteína recombinante de las células transformadas.

10 En efecto, para estabilizar la estructura del dominio DTR aislado, y mejorar la extracción y la purificación de este dominio a partir de bacterias transformadas, ha sido indispensable fusionar el dominio DTR a una proteína (Glutación-S-transferasa, GST) o a un dominio de proteína (dominio ZZ procedente de la proteína A de *S. aureus* (Lobeck et al., Infect. Immun., 1998, 66, 418-423; Shen et al., J. Biol. Chem., 1994, 269, 29077-29084). Además, se produjeron mutantes del bucle de la región 516-530 de DTR a partir de la fusión GST-DTR; estos mutantes de DTR son incapaces de vincularse al receptor pro-HB-EGF (Shen et al., 1994).

En los casos anteriormente mencionados, la proteína recombinante producida en *E. coli* no es un dominio DTR aislado, sino una proteína de fusión GST-DTR o ZZ-DTR. En el caso de la proteína de fusión GST-DTR, los rendimientos de producción son bajos, y es indispensable utilizar un detergente (Triton X-100 al 1 %) para extraer la proteína de fusión de las bacterias transformadas. Además, para producir una proteína recombinante, el ligando de fusión se debe eliminar, lo que convierte el procedimiento en algo mucho más complejo y disminuye aún más los rendimientos.

Los inventores han construido mutantes del dominio DTR aislado, desprovistos de secuencias de un ligando de fusión. Estos mutantes del dominio DTR aislado se expresan directamente y en gran cantidad en forma de una proteína DTR recombinante soluble, de tamaño pequeño (aproximadamente 17500 Da) afin por el pro-HB-EGF y el HB-EGF. Estos mutantes de DTR se han modificados para producir proteínas DTR recombinantes mejoradas, que de forma sorprendente, tienen, al mismo tiempo, una antigenicidad y una inmunogenicidad reducidas y una afinidad considerablemente aumentada, en comparación con CRM197.

30 Objeto de la invención

En consecuencia, la presente invención tiene por objeto una proteína recombinante que comprende un dominio R aislado de la toxina diftérica que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad con los restos 380 a 535 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1 correspondientes al dominio R de la toxina diftérica, comprendiendo dicha secuencia la combinación de sustituciones Y380K y L390T, y estando dicha secuencia desprovista en sus extremos N o C de dicho dominio R, de la secuencia del dominio C y del dominio T de la toxina diftérica y de la secuencia de una proteína o de un dominio de proteína capaz de mejorar la estabilidad o la purificación de dicho dominio R, y siendo dicha proteína recombinante un ligando inhibidor del HB-EGF.

40 La invención es tal como se ha definido en las reivindicaciones.

La invención proporciona una proteína recombinante que es un ligando terapéutico del HB-EGF y de pro-HB-EGF que tiene las siguientes ventajas:

- 45 - tiene una solubilidad muy aumentada con respecto a la forma natural (WT, del inglés *wild type*) DTR_{WT}. La combinación de las sustituciones Y380K y L390T, permite aumentar considerablemente la solubilidad de la proteína DTR en solución acuosa. De este modo, la proteína recombinante de acuerdo con la invención se puede extraer de las células hospedadoras y purificarse sin utilizar detergentes o agentes caotrópicos o desnaturalizantes. Por comparación, la proteína DTR natural (DTR_{WT}), producida en el mismo sistema de expresión, es insoluble y no se solubiliza utilizando detergentes compatibles con el uso terapéutico. La proteína DTR_{WT} se solubiliza en presencia de sarcosilo al 0,5 % o dodecil sulfato de sodio, detergentes incompatibles con el uso terapéutico a dichas concentraciones.
- 50 - es mucho más fácil de producir en forma recombinante que DTR_{WT}. Se produce directamente, sin utilizar ligandos de fusión para mejorar la estabilidad o la purificación del dominio R. Se produce en *E. coli* según procedimientos de fermentación convencionales, en forma soluble, replegada, y en gran cantidad después de su purificación final (varias decenas de mg/l de cultivo en condiciones de laboratorio no optimizadas).
- 55 - tiene una afinidad por HB-EGF y proHB-EGF al menos 10 veces superior a la de CRM197. De manera sorprendente, aunque la proteína DTR natural (DTR_{WT}) tiene una afinidad por HB-EGF y proHB-EGF que es menor en un factor de 2 a la de CRM197, las proteínas DTR mutantes de acuerdo con la invención tienen una afinidad por HB-EGF y pro-HB-EGF considerablemente superior a la de CRM197; las proteínas denominadas DTR1, DTR3 y DTR8 tienen, respectivamente, una afinidad 60, 300 y 1400 veces superior a la de CRM197. Esto significa que DTR8 se podría utilizar a dosis muy inferiores a las de CRM197 para conseguir un mismo efecto terapéutico. De este modo, los riesgos de producirse efectos secundarios, generalmente vinculados a la existencia de uniones de baja afinidad con otras proteínas o ligandos del organismo, se reducen considerablemente, de este modo, en comparación con CRM197. Estas interacciones se suprimen mediante el uso de dosis, del orden pM, lo que debería ser el caso de DTR8.
- 60
- 65

- tiene una inmunogenicidad disminuida con respecto a la de CRM197 y DTR_{WT}. Diez de los 26 epítomos T identificados en DTR_{WT} se han suprimido en la proteína DTR8 mediante mutagénesis dirigida, entre ellos, 7 de los 9 epítomos inmunodominantes.
 - tiene una antigenicidad muy disminuida con respecto a la de CRM197 y DTR_{WT}. Los sueros de individuos vacunados contra la toxina diftérica reconocen preferentemente el dominio catalítico de la misma. Este dominio está presente en la molécula CRM197 y ausente en la proteína DTR mutada de acuerdo con la invención. Por otro lado, la proteína DTR mutada de acuerdo con la invención es menos bien reconocida que DTR_{WT} por los anticuerpos de sujetos vacunados que reconocen DTR_{WT}.
 - bloquea una vía de activación del EGFR (ErbB1 y ErbB4) por el HB-EGF de forma mucho más específica que los inhibidores comerciales del EGFR (moléculas pequeñas y anticuerpos terapéuticos), y tiene por este motivo, potencialmente, un riesgo mucho menor de producirse efectos secundarios,
 - tiene un tamaño pequeño; las proteínas de las SEQ ID NO:2 a 5 y SEQ ID NO:7 a 9 tienen una secuencia de 158 aminoácidos y un PM de aproximadamente 17500 Da, es decir, un tamaño 3,4 veces inferior al de CRM197 y 8,8 veces inferior al de los anticuerpos anti-HB-EGF utilizados actualmente en los protocolos clínicos para bloquear la ruta HB-EGF. Debido a su pequeño tamaño, la proteína recombinante de acuerdo con la invención es más eficaz en el tratamiento de patologías relacionadas con la activación de la ruta del HB-EGF, especialmente la GNRP o el cáncer de ovario, debido a que se difunde más fácilmente en los tejidos, especialmente los tumores, y puesto que puede penetrar en los glomérulos renales.
- Además, por su elevada afinidad por HB-EGF y pro-HB-EGF, la proteína de acuerdo con la invención también se puede utilizar para el diagnóstico de enfermedades que impliquen la activación de la ruta del HB-EGF/EGFR.

Definiciones

- En la presente solicitud, se entiende por "DTR" o "dominio DTR", el dominio R de la toxina diftérica que corresponde a los restos 380-385 a 531-535 de la secuencia de aminoácidos de la toxina diftérica natural (SEQ ID NO:1).
- La expresión "proteína DTR" designa una proteína recombinante que comprende un dominio DTR aislado, es decir, desprovisto en sus extremos N o C de la secuencia del dominio C y del dominio T de la toxina diftérica y de la secuencia de una proteína o un dominio de proteína capaz de mejorar la estabilidad o la purificación de dicho dominio R. Además, la purificación del dominio R incluye la extracción y purificación de dicho dominio, dado que se produce en forma de una proteína recombinante.
- La proteína recombinante de acuerdo con la invención que comprende al menos dos sustituciones tal como se han definido anteriormente se denomina con el nombre de proteína DTR mutante, proteína DTR mutada o proteína DTR_n donde n es un número entero, por oposición a la proteína recombinante DTR natural (DTR_{WT}) que no comprende dicha sustitución.
- Los aminoácidos se denominan según el código de una letra.
- La similitud entre una secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de referencia se valora en función del porcentaje de los restos de aminoácidos que son idénticos o que difieren por sustituciones conservativas, cuando las dos secuencias se alinean para obtener la máxima correspondencia entre las mismas. Cuando solamente se tienen en cuenta los restos idénticos, y se determina el porcentaje de restos idénticos, se habla entonces de la identidad de dicha secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de referencia. En el sentido de la presente invención, por sustitución conservativa en la secuencia de aminoácidos de una proteína, se entiende la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido natural o sintético que tenga propiedades químicas o físicas similares (tamaño, carga o polaridad), que no tienen ningún efecto perjudicial sobre la actividad biológica de la proteína. Por tanto, dos secuencias de aminoácidos de una proteína son similares cuando difieren entre sí por la sustitución de un aminoácido, la delección y/o la inserción de un aminoácido o de un número reducido de aminoácidos (inferior a 5) en posiciones que no tienen ningún efecto perjudicial sobre la actividad biológica de dicha proteína. El experto en la materia puede calcular el porcentaje de similitud o identidad mediante un programa informático de comparación de secuencias tal como, por ejemplo, el de la suite informática BLAST (Altschul et al., NAR, 1997, 25, 3389-3402). Los programas BLAST se aplican utilizando los parámetros preconfigurados, para una ventana de comparación formada por los restos 380 a 535 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.
- Salvo indicación en contra, el término "HB-EGF" designa a la vez el precursor de membrana (pro-HB-EGF) y la forma secretada del HB-EGF.
- La actividad del ligando inhibidor del HB-EGF se refiere a la capacidad de unión a pro-HB-EGF y al HB-EGF y a la inhibición de diferentes fenómenos biológicos cuantificables, tales como:
 - la inhibición del efecto tóxico de la toxina diftérica sobre células humanas o simias tales como células Vero,
 - la inhibición de la actividad proliferativa del HB-EGF sobre células que expresan los subtipos ErbB1 y/o ErbB4 del EGFR y cuyo crecimiento es independiente del HB-EGF, tal como una línea de células linfoides de murino Ba/F3 transfectada con el gen del EGFR.

La proteína recombinante de acuerdo con la invención comprende un dominio DTR aislado, desprovisto en sus extremos N o C de una de las secuencias siguientes: (1) la secuencia del dominio C y del dominio T de la toxina diftérica, y (2) la secuencia de un ligando de fusión que puede mejorar la estabilidad del dominio DTR, tal como la secuencia de la glutatión-S-transferasa (GST) o capaz de mejorar la extracción y purificación del dominio DTR a partir de las bacterias transformadas, tal como la secuencia de un dominio de unión de las inmunoglobulinas procedente de la proteína A de *S. aureus* (dominio ZZ).

La proteína recombinante de acuerdo con la invención comprende por lo general un dominio DTR aislado que se extiende entre los restos 380 y 535 de la secuencia SEQ ID NO:1 y comprende la combinación de las sustituciones Y380K y L390T. No obstante, también puede comprender un dominio DTR aislado algo más corto cuyo extremo N está en la posición 381 a 385 y el extremo C en la posición 531 a 534 de la secuencia SEQ ID NO:1. Cuando la secuencia del extremo N de DTR está en la posición 381 o 382, la proteína recombinante de acuerdo con la invención comprende la sustitución del resto L390. Cuando la secuencia del extremo N de DTR está en la posición 383, 384 o 385, la proteína recombinante de acuerdo con la invención comprende la sustitución del resto L390.

La proteína recombinante de acuerdo con la invención comprende opcionalmente una metionina (M) en su extremo N y/o secuencias adicionales en los extremos N y/o C del dominio DTR. En efecto, el precursor de dicha proteína recombinante comprende una metionina en el extremo N que se puede escindir mediante modificaciones posteriores a la traducción, de forma que está ausente en la proteína recombinante madura.

En aplicaciones terapéuticas, la proteína de acuerdo con la invención está constituida sucesivamente de: (1) una secuencia de 1 a 10 aminoácidos, preferentemente de 1 a 5 aminoácidos, de forma preferida de 1 o 2 aminoácidos, la secuencia del precursor y opcionalmente la de la proteína madura que se inicia con una metionina (M), por ejemplo una secuencia MG, y (2) un dominio DTR mutado tal como se define más adelante. Una proteína terapéutica de ese tipo tiene un tamaño pequeño, de aproximadamente 145 a 200 aminoácidos, preferentemente de 145 a 175 aminoácidos, preferentemente, de aproximadamente 160 aminoácidos.

En aplicaciones diagnósticas, la proteína de acuerdo con la invención se marca, especialmente con un trazador peptídico que se puede detectar por medición de una señal adecuada. El trazador peptídico es, especialmente, una etiqueta reconocida por un anticuerpo, una proteína fluorescente, o un péptido unido como mínimo a un átomo de tecnecio 99. El marcador se encuentra en el extremo N o el extremo C de la proteína, es decir, fusionado, directamente, o mediante un separador peptídico, respectivamente, al extremo N o al extremo C del dominio DTR. Una proteína de ese tipo tiene un tamaño de aproximadamente 145 a 500 aminoácidos, preferentemente de 145 a 300 aminoácidos, de forma preferida de aproximadamente 145 a 200 aminoácidos.

La invención abarca las proteínas recombinantes modificadas derivadas de la anterior mediante la introducción de cualquier modificación en uno o más restos de aminoácidos, en el enlace peptídico o en los extremos de la proteína recombinante, siempre que dicha proteína modificada mantenga una buena afinidad y una actividad inhibidora con respecto al HB-EGF y al pro-HB-EGF. Estas modificaciones, que se introducen en las proteínas usando métodos clásicos conocidos del experto en la materia, incluyen de forma no limitativa: la sustitución de un aminoácido por un aminoácido sintético (aminoácido D o análogo de aminoácido); adición de un grupo químico (lípidos, oligo o polisacárido) en una función reactiva, especialmente en la cadena lateral R; la modificación del enlace péptido (-CO-NH-), especialmente mediante un enlace de tipo retro o retroinverso (-NH-CO-) o un enlace diferente del enlace peptídico; la ciclación; la fusión (mediante ingeniería genética) con un péptido o una proteína de interés o acoplamiento (mediante enlace químico) a una molécula de interés, especialmente con un agente de marcado o trazador detectable por medición de una señal.

Dicha proteína comprende al menos las sustituciones Y380K y L390T. Por ejemplo, dicha proteína comprende una de las combinaciones de sustituciones siguientes: Y380K y L390T; Y380K, Q387E y L390T; Y380K, Q387E, P388T y L390T; Y380K, Q387E, P382T e L390T. Preferentemente, se trata de una proteína que comprende o consiste en una de las secuencias SEQ ID NO:2 a 5.

De manera aún más preferida, dicha proteína comprende las sustituciones Y380K, Q387E y L390T. Por ejemplo, dicha proteína comprende o consiste en una de las secuencias SEQ ID NO:3 a 5, preferentemente la secuencia SEQ ID NO:3.

De acuerdo con otra realización ventajosa de dicha proteína, esta comprende además la sustitución A395T. La adición de la sustitución produce un aumento adicional del rendimiento de proteína soluble. Preferentemente, dicha proteína comprende la secuencia SEQ ID NO:7; esta proteína, denominada DTR1, comprende las sustituciones Y380K, Q387E, L390T y A395T. La afinidad de unión de la proteína DTR1 a HB-EGF está aumentada en un factor de 60 en comparación con CRM197, y en un factor de 130 en comparación con la proteína DTR_{WT} solubilizada con un 0,5 % del detergente sarcosilo.

De acuerdo con otra realización adicional ventajosa de dicha proteína, esta comprende además, al menos una de las sustituciones F389Y y/o G510A. La adición de una de estas sustituciones aumenta la afinidad de unión de la proteína DTR a HB-EGF. Además, la combinación de las dos sustituciones produce un aumento adicional de la afinidad de unión a HB-EGF, con respecto al aumento obtenido con una sola sustitución. Preferentemente, dicha proteína comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO:8; esta proteína, denominada DTR3, comprende las sustituciones Y380K, Q387E, L390T, A395T, F389Y y G510A. La afinidad de la proteína DTR3 por el HB-EGF está aumentada en un factor de 5 en comparación con la de DTR1, y en un factor de 300 en comparación con la de CRM197.

De acuerdo con otra realización ventajosa de dicha proteína, esta comprende igualmente al menos una sustitución

seleccionada del grupo que consiste en: N399K, V452T, T517E, V483Q, H492E, S494K, T436H y E497D. Dicha proteína comprende ventajosamente al menos 3, preferentemente al menos 5 de dichas sustituciones.

Preferentemente, dicha proteína comprende las sustituciones N399K, V452T, T517E, V483Q, H492E y S494K. Estas mutaciones han permitido eliminar 10 de los 26 epítomos T CD4 identificados en DTR_{WT}. Entre estos 10 epítomos, se encuentran 7 de los 9 epítomos previstos como los epítomos inmunodominantes de DTR_{WT}. La capacidad de la proteína resultante, para inducir una respuesta inmunitaria de tipo CD4, es decir, productora de anticuerpos, se encuentra por tanto considerablemente disminuida con respecto a la de DTR_{WT}. De forma notable e inesperada, la adición de las seis mutaciones destinadas a reducir la inmunogenicidad de DTR ha contribuido a aumentar su afinidad por HB-EGF.

Preferentemente, dicha proteína comprende o consiste en la secuencia SEQ ID NO:9; esta proteína, denominada DTR8, comprende las sustituciones Y380K, Q387E, L390T, A395T, F389Y, G510A, N399K, V452T, T517E, V483Q, H492E y S494K. Tiene un peso molecular de 17458 Da.

La afinidad de la proteína DTR8 por el HB-EGF está aumentada en un factor de 3 en comparación con la de DTR3, y en un factor de 1400 en comparación con la de CRM197. Además, DTR8 es al menos 300 veces más eficaz que CRM197 para unirse al HB-EGF secretado e inhibir la ruta HB-EGF/EGFR.

La antigenicidad de la proteína DTR8 resulta ser muy reducida con respecto a la de CRM197. En efecto, la parte más importante de los anticuerpos presentes en adultos vacunados contra la DT (vacunación obligatoria) se dirige contra el dominio catalítico de la DT. De manera sorprendente e inesperada, la antigenicidad de la proteína DTR8 resulta ser reducida con respecto a la de DTR1 y, por tanto, respecto a DTR_{WT}.

La proteína de acuerdo con la invención puede comprender sustituciones adicionales, en particular, de restos situados en la superficie del dominio DTR, para reducir todavía más su antigenicidad.

De acuerdo con otra realización ventajosa de dicha proteína, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, 85 % o 90 % de identidad, con los restos 380 a 535 de la secuencia SEQ ID NO:1.

De acuerdo con otra realización ventajosa de dicha proteína, está marcada con un trazador detectable. Los medios y las técnicas de marcado de proteínas son bien conocidos del experto en la materia e incluyen el marcado radiactivo, magnético o fluorescente que se puede llevar a cabo directa o indirectamente. Los agentes de marcado directo son especialmente isótopos radiactivos tales como tritio (³H), yodo (¹²⁵I) y tecnecio (^{99m}Tc) o compuestos luminiscentes (radioluminescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, fluorescentes o fosforescentes) tales como fluoróforos tales como, de forma no limitativa, AlexaFluor®, FITC y Cianina 3, y proteínas fluorescentes tales como la GFP y sus derivados. Los agentes de marcado indirecto incluyen especialmente las enzimas y las etiquetas epitópicas reconocidas por un anticuerpo específico. El marcado se lleva a cabo especialmente mediante: (1) injerto de un fluoróforo en un grupo reactivo tal como una amina reactiva de un resto lisina, (2) incorporación de un grupo reactivo (cisteína libre) por síntesis química o producción recombinante, y posterior utilización de este grupo para injertar un fluoróforo, (3) incorporación directa de un fluoróforo, en el extremo N o C, mediante síntesis química, (4) incorporación directa de una proteína fluorescente o de una enzima mediante la producción de una proteína de fusión. Dichas proteínas marcadas se utilizan especialmente como reactivo para el diagnóstico *in vitro* o *in vivo* (mediante obtención de imágenes) de enfermedades relacionadas con la activación de la ruta HB-EGF/EGFR o como herramienta para el estudio de esta ruta de activación. La proteína DTR se puede marcar directamente mediante acoplamiento covalente del tecnecio (^{99m}Tc) o de un trazador fluorescente; el trazador fluorescente está especialmente acoplado a uno de los restos lisina de la proteína DTR.

La proteína recombinante de la presente invención se puede producir mediante un procedimiento en el que un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica dicha proteína unida de forma funcional a elementos reguladores que permiten su expresión en el hospedador elegido, se transfiere a una célula hospedadora que se cultiva en condiciones que permitan la expresión de dicha proteína. A continuación, la proteína producida se recupera y se purifica. Los procedimientos de purificación utilizados son conocidos del experto en la técnica. La proteína recombinante obtenida se puede purificar a partir de lisados y extractos celulares, del sobrenadante del medio de cultivo, con métodos utilizados individualmente o en combinación, tales como el fraccionamiento, métodos de cromatografía, técnicas de inmovilización mediante anticuerpos monoclonales o policlonales específicos. La proteína recombinante obtenida es soluble.

La presente invención tiene también por objeto un polinucleótido aislado que codifica dicha proteína recombinante. Dicho polinucleótido comprende ventajosamente una secuencia de codificación optimizada para la expresión en el hospedador celular en donde se produce la proteína de la invención. Preferentemente, dicho polinucleótido comprende la secuencia SEQ ID NO:10, 12 o 14 que está optimizada para la expresión en *E. coli* y codifica respectivamente la proteína recombinante DTR1, DTR3 y DTR8. El polinucleótido de la invención es un ADN o un ARN preparado por los métodos convencionales de síntesis química o de biología molecular conocidos por el experto en la materia.

La presente invención tiene igualmente por objeto un vector recombinante de clonación y/o de expresión que comprende dicho polinucleótido. Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión que comprende dicho

polinucleótido unido de manera funcional a secuencias reguladoras que permiten la expresión de la proteína de la invención en el hospedador celular utilizado para la producción de dicha proteína (promotor, activador, codón de inicio (ATG), codón de detención, señal de finalización de transcripción). El vector, replicador o integrador, especialmente un plásmido o un vector vírico, se prepara según los métodos habitualmente utilizados por el experto en la materia.

La presente invención tiene también por objeto una célula hospedadora modificada de forma transitoria o estable mediante un vector recombinante tal como se ha definido anteriormente. Estas células se pueden obtener mediante la introducción en una célula hospedadora eucariota de un vector recombinante tal como se ha definido anteriormente, según métodos convencionales conocidos del experto en la materia, tales como la electroporación. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen especialmente las células de mamíferos, de insectos, de bacterias tales como *E. coli* y levaduras.

La presente invención tiene igualmente por objeto una composición farmacéutica, que comprende al menos una proteína recombinante o vector recombinante de expresión tales como se han definido anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica comprende una dosis eficaz de proteína o de vector que permite obtener un efecto terapéutico sobre las enfermedades asociadas a una activación de la ruta HB-EGF/EGFR tales como se han definido anteriormente. De manera general, una cantidad terapéuticamente eficaz está comprendida de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 100 mg, preferentemente de 10 µg a 10 mg, se puede administrar a adultos humanos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son los utilizados de forma clásica. La composición se presenta en una forma farmacéutica adaptada a la administración elegida: solución estéril inyectable, polvo, comprimidos, cápsulas, suspensión, jarabe, supositorios, que se preparan según los protocolos normalizados. La administración puede ser subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral, sublingual, rectal, vaginal, intranasal, mediante inhalación, o por aplicación transdérmica.

Las vías de administración, las posologías y formas farmacéuticas de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se pueden determinar de la forma habitual por el experto en la materia, especialmente según los criterios generalmente utilizados para establecer un tratamiento terapéutico adaptado a un paciente (por lo general, un ser humano y opcionalmente un mamífero no-humano), como por ejemplo, la edad, el peso corporal, la gravedad de su estado general, la tolerancia del tratamiento y los efectos secundarios comprobados.

La presente invención tiene también por objeto una proteína recombinante tal como se ha definido anteriormente como un medicamento.

La presente invención se refiere también a una proteína recombinante tal como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de la ruta HB-EGF/EGFR.

La presente invención tiene también por objeto el uso de una proteína recombinante tal como se ha definido anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de la ruta HB-EGF/EGFR.

La presente invención tiene también por objeto un método para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la activación de la ruta HB-EGF/EGFR, que comprende la administración de una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente, a un individuo. La administración se realiza de acuerdo con una vía y una pauta adecuados tales como se han definido anteriormente.

Preferentemente, dichas enfermedades se seleccionan entre el grupo seleccionado por: glomerulonefritis de rápida progresión (GNRP), cánceres, especialmente el cáncer de ovario, del endometrio, de mama, del útero (adenocarcinoma uterino), de la vesícula, de estómago, de la piel (melanoma maligno), de cerebro (glioblastoma) y de pulmón, vasoespasma asociado a contusiones cerebrales, hipertrofia cardíaca, hiperplasia de las células de la musculatura lisa, hipertensión pulmonar, retinopatías diabéticas y restenosis arterial.

La presente invención tiene también por objeto el uso de una proteína tal como se ha definido anteriormente, para el diagnóstico *in vitro* o *in vivo* de una enfermedad relacionada con la activación de la ruta del HB-EGF/EGFR.

La invención se refiere también a un método de diagnóstico *in vitro* de una enfermedad relacionada con la activación de la ruta del HB-EGF/EGFR, que comprende la puesta en contacto de una muestra biológica con una proteína marcada tal como se ha definido anteriormente, en condiciones que permitan la formación de un complejo específico entre dicha proteína marcada y el HB-EGF y/o el proHB-EGF, y la detección de dichos complejos marcados de proteína/HB-EGF, por cualquier medio adecuado.

La muestra biológica es especialmente una muestra de biopsia (riñón, tumor, musculatura lisa, corazón, pulmón, vasos, retina), suero u orina.

La presente invención tiene también por objeto el uso de una proteína recombinante tal como se ha definido

anteriormente para la detección, *in vitro* o *in vivo*, del HB-EGF.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de detección del HB-EGF, *in vitro* e *in vivo*, que comprende al menos las siguientes etapas:

- la puesta en contacto de células a analizar con una proteína marcada tal como se ha definido anteriormente, y
- la detección de células y/o del medio extracelular marcados, por cualquier medio adecuado.

Este procedimiento permite determinar el perfil de expresión tisular del HB-EGF en condiciones fisiológicas, patológicas o en respuesta a un estímulo endógeno o exógeno. La detección del HB-EGF, *in vivo*, en el organismo de un mamífero (obtención de imágenes celulares), especialmente en tiempo real, comprende una etapa anterior de administración de dicha proteína a dicho mamífero (inyección parenteral, administración oral). La detección del HB-EGF *in vivo* en el ser humano se puede utilizar para el diagnóstico de una enfermedad relacionada con la activación de la ruta del HB-EGF/EGFR.

El marcado de las células y del medio extracelular que contiene el HB-EGF es especialmente un marcado fluorescente, radiactivo, o un marcado magnético, que se puede detectar por cualquier técnica conocida por el experto en la materia (microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, gammagrafía, imagen de resonancia magnética).

La invención tiene también por objeto un kit para la aplicación de los métodos de diagnóstico o de detección que se han descrito anteriormente, que comprende una proteína marcada tal como se ha definido anteriormente.

Descripción de las figuras

Además de las disposiciones precedentes, la invención comprende además otras disposiciones, que se pondrán de manifiesto con la descripción que sigue a continuación, que se refiere a ejemplos de aplicaciones del objeto de la presente invención, con referencia a los dibujos anexos en los que:

- la figura 1 representa las mutaciones (A) y el análisis (B) de las fracciones solubles e insolubles de los 5 clones seleccionados por cribado del banco R1 para producir una proteína DTR más soluble que DTR_{WT}. Todos los clones son solubles; el mejor clon es el clon 1D6.
- la figura 2 muestra los efectos de las mutaciones A395T y N399D sobre la solubilidad de la proteína DTR producida por el clon 1D6 (aquí denominado G1). El mejor clon contiene la mutación A395T.
- la figura 3 representa: (A) la inhibición del efecto tóxico de dosis crecientes de toxina diftérica sobre células Vero mediante dosis crecientes de DTR1 y (B) la regresión de Schild para evaluar el valor de K_d de DTR1 para HB-EGF según la ecuación $\log(CE_{50} - 1) = K_d \log(B)$ donde CE_{50} es la concentración de toxina diftérica que proporciona el 50 % de toxicidad y B la concentración del inhibidor DTR1.
- la figura 4 representa la inhibición del efecto tóxico de la toxina diftérica a la concentración de 10^{-11} M sobre células Vero para todos los mutantes de DTR1 (aquí denominado G2) a una concentración de 10^{-9} M.
- la figura 5 representa: (A) la inhibición del efecto tóxico de dosis crecientes de toxina diftérica sobre células Vero mediante dosis crecientes de DTR8 y (B): la regresión de Schild para evaluar el valor de K_d de DTR8 para HB-EGF según la ecuación $\log(CE_{50} - 1) = K_d \log(B)$ donde CE_{50} es la concentración de toxina diftérica que proporciona el 50 % de toxicidad y B la concentración del inhibidor DTR8.
- la figura 6 representa la inhibición del efecto proliferativo de dosis crecientes de HB-EGF sobre células Ba/F3 que expresan EGFR y dependencia de HB-EGF para su crecimiento, mediante dosis crecientes de DTR8 (A) y de CRM197 (B).
- la figura 7 representa el reconocimiento de las proteínas CRM197, dominio C (C) y dominio T (T) de la toxina diftérica, DTR1 y DTR8 por los anticuerpos presentes en el suero de 20 donantes sanos. El título se define mediante la dilución del suero donante de una señal de fluorescencia de 5000 unidades arbitrarias en el ensayo ELISA, tras restar el ruido de fondo. Un título ≤ 20 corresponde al ruido de fondo y, por tanto, a ausencia de unión del anticuerpo cuantificable. De forma arbitraria, se fijó un título de 30 para distinguir entre respuestas de anticuerpos débiles y las respuestas medias o fuertes.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo 1: Materiales y métodos

1) Clonación de las secuencias genéticas, expresión y purificación de la proteína DTR_{WT} y de sus mutantes

La secuencia genética que codifica el dominio DTR de la toxina diftérica, que recubre la secuencia Y380-S535 de la toxina natural fue el punto de partida de este estudio. Todas las secuencias genéticas se sintetizaron después de la optimización tras una expresión en *E. coli* por la empresa GENEART según las secuencias proteicas previamente determinadas. Sus secuencias se clonaron en el vector pET28a(+) (NOVAGEN) entre los sitios de restricción *NcoI* y *SalI*. La presencia del sitio *NcoI* genera los codones no nativos M y G correspondientes al extremo N de la proteína recombinante. La secuencia SEQ ID NO:16 es la secuencia nucleotídica optimizada que codifica la proteína DTR natural (DTR_{WT}) de 158 aminoácidos que consiste en los restos M y G seguidos por los restos Y380 a S535 de la

toxina diftérica natural. Las secuencias nucleotídicas optimizadas que codifican las formas mutantes y solubles de la proteína DTR se derivan de la secuencia SEQ ID NO:16 por sustitución de cada codón a mutar por un codón optimizado que codifica el aminoácido mutado, como se indica en la Tabla I:

5 **Tabla I: Lista de codones optimizados seleccionados según las mutaciones de DTR**

Mutación	Codón natural	Codón mutado optimizado
Y380K	tac	aaa
Y380E	tac	gaa
P382T	ccg	acg
Q387E	cag	gag
Q387K	cag	aag
P388T	ccg	acg
F389Y	ttt	tat
L390T	ctg	acc
L390N	ctg	aac
H391K	cat	aaa
A395T	gcg	acc
N399D	aac	gat
N399K	aac	aaa
V401Q	gtg	cag
L427Q	ctg	cag
L427N	ctg	aac
L427S	ctg	agc
T436K	acc	aaa
T436H	acc	cat
V452T	gtg	acg
I457D	att	gat
I457E	att	gaa
R460T	cgt	acc
A463T	gcg	acc
A463S	gcg	agc
A463E	gcg	gaa
A463D	gcg	gat
A463G	gcg	ggc
Y478T	tat	acc
V483D	gtg	gat
V483E	gtg	gaa
V483H	gtg	cat
V483Q	gtg	cag
A490G	gcg	ggc

Mutación	Codón natural	Codón mutado optimizado
H492E	cat	gaa
S494K	agc	aaa
S496K	agc	aaa
E497D	gaa	gat
G510A	ggc	gcg
G510M	ggc	atg
G510Q	ggc	cag
G510S	ggc	agc
Q515E	cag	gaa
T517D	acc	gat
T517E	acc	gaa
T521R	acc	cgc
K522R	aaa	cgc

La expresión de la proteína DTR_{WT} se llevó a cabo en la bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3) en medio Terrific Broth en presencia de 50 µg/ml de kanamicina a 37°C. La inducción de la proteína se consiguió mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG). Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 5000 g durante 45 min y se lisaron en tampón fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,25 mM, lisozima (0,25 mg/ml), pH 8 por paso en el Cell Disrupter (CONSTANT SYSTEM). Los cuerpos de inclusión que contenían la proteína se solubilizaron en una solución que contenía urea 8 M y Tris-HCl 0,1 M, pH 8. La proteína se purificó por cromatografía de intercambio de cationes en una columna HiTrap™ SP 5 ml (GE HEALTH CARE LIFE SCIENCES) con un gradiente de tampón entre urea 8 M y Tris-HCl 0,1 M, pH 8 y urea 8 M, NaCl 1 M en Tris-HCl 0,1 M, pH 8, y después replegada mediante diálisis en 2 etapas, en primer lugar, contra un tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, cisteína 1 mM/cistina 8 mM, sarcosilo al 0,5 %, pH 8 y después contra un tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 50 mM, sarcosilo al 0,5 %, pH 8.

La expresión de las formas mutantes y solubles de la proteína DTR se llevó a cabo en la bacteria *Escherichia coli* BL21(DE3) en medio 2YT en presencia de 50 µg/ml de kanamicina. Después de 2 h 20 min de cultivo a 37°C, la inducción de la proteína se realizó por adición de IPTG 1 mM. A continuación, después de 4 h 30 min a 30°C, las bacterias se recuperaron por centrifugación a 5000 g durante 30 min y se lisaron en un tampón fosfato de sodio 20 mM, PMSF 0,25 mM, MgCl₂ 2 mM, con adición de benzonasa (6,25 U/ml), pH 7,8 en el Cell Disrupter (CONSTANT SYSTEM). La proteína, soluble en la mezcla de lisis, se purificó por cromatografía de intercambio de cationes en una columna HiTrap™ SP 5 ml con un gradiente entre fosfato de sodio 20 mM pH 7,8 y fosfato de sodio 20 mM, NaCl 1 M pH 7,8 (GE) y almacenado a -20°C en un tampón fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,8.

2) Cribado de selección de mutantes solubles

Tres bancos de secuencias de DTR fabricadas mediante síntesis y clonadas en el plásmido pET28a(+) se transfectaron en la cepa *E. coli* BL21(DE3) (GENEART). Para cada banco, se repicaron clones en 2 o 4 placas de 96 pocillos en medio de cultivo en presencia de un antibiótico de selección y del inductor de expresión (IPTG). Tras el crecimiento, las bacterias se lisaron mediante una solución Bugbuster™ (0,5X final) (NOVAGEN) con adición de Lysonase™ (NOVAGEN). Tras centrifugación de las placas durante 20 min a 2700 g a 4°C, se evaluó la presencia de cuerpos de inclusión un pocillo tras otro según el tamaño del aglomerado y la fracción de proteína soluble se identificó por análisis de los sobrenadantes de lisis en un gel de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización y coloración con azul de Coomassie.

3) Ensayo de actividad de las proteínas DTR por inhibición de la toxicidad de la toxina diftérica

Células Vero (ATCC CCL-81™) se sembraron en placas de 96 pocillos Cytostar-T™ (PERKIN ELMER) con fondo de centelleo a 50.000 células por pocillo en medio D-MEM (medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco) con adición de glutamina 2 mM, una solución de penicilina/estreptomina al 1 %, una solución de aminoácidos no esenciales al 1 % y suero bovino fetal al 10 %. Se añadieron por duplicado concentraciones variables de toxina diftérica (SIGMA). Estas condiciones se repitieron en presencia del agonista analizado: proteína DTR_{WT}, DTR mutante o CRM197 (Sigma). Después de 22 h de incubación a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5%, el medio de cultivo se sustituyó por medio sin leucina que contenía 1 µCi/pocillo de ¹⁴[C]-leucina (GE HEALTH CARE LIFE SCIENCES).

Después de 5 h de incubación a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5%, la radioactividad incorporada a las células se contó introduciendo las placas revestidas de película adhesiva en un aparato MicroBeta® (WALLAC).

4) Ensayo de actividad de las proteínas DTR mediante inhibición de la actividad proliferadora del HB-EGF

El ensayo utiliza una línea de células linfoides de murino Ba/F3 (Palacios, R & Steinmetz, M., Cell, 1985, 81, 727-734) transfectadas en el laboratorio con el gen del EGFR. Esta línea es dependiente del HB-EGF o de la anfirregulina para su crecimiento. Las células se sembraron en placas de 96 pocillos Nunc™ (NUNC) a 10.000 células por pocillo en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 con adición de glutamina 2 mM, una solución de penicilina/estreptomicina al 1 %, una solución de aminoácidos no esenciales al 1 % y suero bovino fetal al 10 %. Se añadieron por duplicado concentraciones variables de HB-EGF o anfirregulina. Estas condiciones se repitieron en presencia del agonista analizado: proteína DTR mutante o CRM197. Después de 24 h de incubación a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5%, 1 µCi/pocillo de ³[H]-timidina (GE HEALTH CARE LIFE SCIENCES) se añadió a cada pocillo. Después de 5 h de incubación a 37 °C en una atmósfera con CO₂ al 5%, las células se aspiraron sobre un filtro de fibra de vidrio (filtermat A, WALLAC) con un aparato TOMTEC®. Tras el secado de los filtros, estos se introdujeron en una bolsa sellada en presencia de líquido de centelleo y la radioactividad incorporada a las células se contó en un aparato MicroBeta® (WALLAC).

5) Identificación de los epítomos T CD4 de la proteína DTR

La identificación de los epítomos T CD4 de la proteína DTR se llevó a cabo mediante el análisis de los péptidos de la DTR reconocidos por líneas de linfocitos T CD4 específicos de DTR, restringidos a las moléculas HLA-DRB1 mayoritarias en los fenotipos caucásicos. Los protocolos utilizados son los descritos anteriormente en la solicitud WO 2010/076413 salvo por las modificaciones siguientes: (1) las líneas de linfocitos T CD4 específicos de DTR se produjeron mediante cultivo simultáneo de los linfocitos T CD4 del donante con células dendríticas maduras autólogas cargadas con una combinación de péptidos solapantes de DTR y (2) la especificidad de las líneas producidas se analizó en un ensayo ELISPOT-IFN-γ usando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) autólogas cargadas, bien con la combinación de péptidos utilizada para producir la línea de linfocitos T CD4, para comprobar la especificidad de la línea para DTR, bien con un péptido de la combinación, para determinar la especificidad de cada línea.

a) *Aislamiento de los linfocitos T CD4 a partir de PBMC*

Se seleccionaron siete donantes de edad y fenotipo HLA-DRB1 diferentes, de forma que el conjunto de estos donantes expresa las 8 moléculas HLA-DRB1 mayoritarias en los fenotipos caucásicos (HLA-DR1; HLA-DR3; HLA-DR4; HLA-DR7; HLA-DR11; HLA-DR13; HLA-DR15; HLA-DR8). Los linfocitos T CD4 de cada donante se aislaron de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), con un grado de pureza superior al 98 %, mediante trimagnética en columna con partículas magnéticas acopladas a un anticuerpo dirigido contra CD4, según un procedimiento estándar definido por el fabricante (MYLTENYI BIOTECH).

b) *Producción y caracterización de las líneas de linfocitos T CD4 específicos de DTR*

Se sintetizaron 25 péptidos solapantes de 15 aminoácidos que cubren la totalidad de la secuencia del DTR (INTAVIS BIOANALYTICAL INSTRUMENTS).

Tabla II: Péptidos solapantes que cubren la secuencia de DTR (SEQ ID NO:18 a 42)

Péptido	Localización	Secuencia de aminoácidos														
1	378-392	M	G	Y	S	P	G	H	K	T	Q	P	F	L	H	D
2	385-399	K	T	Q	P	F	L	H	D	G	Y	A	V	S	W	N
3	391-405	H	D	G	Y	A	V	S	W	N	T	V	E	D	S	I
4	397-411	S	W	N	T	V	E	D	S	I	I	R	T	G	F	Q
5	403-417	D	S	I	I	R	T	G	F	Q	G	E	S	G	H	D
6	409-423	G	F	Q	G	E	S	G	H	D	I	K	I	T	A	E
7	415-429	G	H	D	I	K	I	T	A	E	N	T	P	L	P	I
8	421-435	T	A	E	N	T	P	L	P	I	A	G	V	L	L	P
9	427-441	L	P	I	A	G	V	L	L	P	T	I	P	G	K	L
10	433-447	L	L	P	T	I	P	G	K	L	D	V	N	K	S	K
11	439-453	G	K	L	D	V	N	K	S	K	T	H	I	S	V	N
12	445-459	K	S	K	T	H	I	S	V	N	G	R	K	I	R	M
13	451-465	S	V	N	G	R	K	I	R	M	R	C	R	A	I	D
14	457-471	I	R	M	R	C	R	A	I	D	G	D	V	T	F	C

Péptido	Localización	Secuencia de aminoácidos														
15	463-477	A	I	D	G	D	V	T	F	C	R	P	K	S	P	V
16	469-483	T	F	C	R	P	K	S	P	V	Y	V	G	N	G	V
17	475-489	S	P	V	Y	V	G	N	G	V	H	A	N	L	H	V
18	482-496	G	V	H	A	N	L	H	V	A	F	H	R	S	S	S
19	488-502	H	V	A	F	H	R	S	S	S	E	K	I	H	S	N
20	494-508	S	S	S	E	K	I	H	S	N	E	I	S	S	D	S
21	500-514	H	S	N	E	I	S	S	D	S	I	G	V	L	G	Y
22	506-520	S	D	S	I	G	V	L	G	Y	Q	K	T	V	D	H
23	512-526	L	G	Y	Q	K	T	V	D	H	T	K	V	N	S	K
24	518-532	V	D	H	T	K	V	N	S	K	L	S	L	F	F	E
25	521-535	T	K	V	N	S	K	L	S	L	F	F	E	I	K	S

Los péptidos se agruparon en 3 combinaciones:

- Combinación 1: péptidos 1 a 8
- 5 - Combinación 2: péptidos 9 a 16
- Combinación 3: péptidos 17 a 25

Cada una de las combinaciones se utiliza *in vitro* para sensibilizar independientemente, de forma repetida, los linfocitos T CD4 procedentes de los donantes seleccionados para el estudio. Se prepararon un mínimo de 30 pocillos de cultivo simultáneo por combinación de péptidos. En un primer momento, los linfocitos T CD4 sensibilizados capaces de reconocer la combinación de péptidos utilizada durante la estimulación, denominados líneas de linfocitos T CD4, se seleccionaron para un ensayo ELISPOT-IFN- γ usando los mismos PBMC autólogos cargados con la combinación de péptidos como células presentadoras del antígeno. En un segundo momento, el uno o varios péptidos reconocidos específicamente por las líneas T CD4 seleccionadas durante el primer análisis se identifican mediante un ensayo ELISPOT-IFN- γ usando PBMC autólogas cargadas por separado con cada uno de los péptidos de la combinación como células presentadoras de antígeno. La especificidad del reconocimiento del antígeno (péptido aislado o combinación de péptidos) está definido por: (1) una relación entre el número de linfocitos T CD4 productores de IFN- γ en respuesta al antígeno (PBMC + péptidos), con respecto al ruido de fondo (ausencia del antígeno, es decir, PBMC solas) que es superior a 2, y (2) un número mínimo de 30 puntos en presencia de antígeno, tras eliminar el ruido de fondo.

6) Evaluación de la antigenicidad de las proteínas DTR

En cada etapa, las incubaciones se llevaron a cabo en una u otra de las tres condiciones siguientes: 1 h a 37°C o 2 h a 20°C o 16 h a 4°C. Las proteínas estudiadas (CRM197, dominio catalítico, dominio de translocación, DTR1 y DTR8) se solubilizaron a la concentración de $1,7 \times 10^{-8}$ M en tampón PBS a pH 7,4 para adsorberse sobre placas de 96 pocillos Maxisorp™ (NUNC). Los pocillos se saturaron con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) (SIGMA) al 3 % en PBS. Después de 4 lavados con una solución de tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, los sueros de donantes sanos se incubaron por duplicado en los pocillos tras dilución al $1/20^{\text{ésimo}}$, $1/200^{\text{ésimo}}$ o $1/2000^{\text{ésimo}}$ en un tampón PBS que contenía BSA al 0,2 % y Tween 20 al 0,05 %. Después de 4 lavados con una solución de tampón PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, un anticuerpo de cabra dirigido contra IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA) se incubó en los pocillos tras dilución al $1/200^{\text{ésimo}}$ en una solución de PBS que contenía BSA al 0,2 % y Tween 20 al 0,05 %. Después de 4 lavados en una solución de PBS que contenía Tween 20 al 0,05 %, el ensayo se reveló por incubación en una solución de fosfato de 4-metilumbeliferilo 0,1 mM (SIGMA) diluida en tampón carbonato 50 mM, MgCl_2 1 mM a pH 9,8 durante 30 min a 20 °C. La fluorescencia de los pocillos (emisión a 450 nm) se midió en un fluorímetro Víctor (WALLAC) por excitación a 365 nm.

Antes de someterse a ensayo, los sueros se dejaron reposar a 20 °C durante un día, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min y después se añadió timerosal al 0,003 % antes del almacenamiento a 4 °C o a -20 °C.

Ejemplo 2: Mejora de la solubilidad de la proteína DTR

La proteína DTR_{WT} expresada en *E. coli* se acumula en cuerpos de inclusión insolubles. La proteína solamente se pudo obtener, solubilizar y purificar en presencia de sarcosilo al 0,5 % o dodecilsulfato de sodio, detergentes incompatibles con el uso terapéutico a dichas concentraciones. El uso de otras moléculas solubilizantes no tuvo resultados (Tween-80, sacarosa, arginina). El uso de agentes caotrópicos tales como la urea o el cloruro de guanidina para solubilizar la proteína, seguido de diálisis contra diferentes tampones de repliegado, tampoco permitió obtener una proteína funcional soluble. La influencia del sitio de truncamiento del DTR con respecto a la secuencia de la toxina diftérica completa se estudió de igual forma. Las formas de DTR que se inician en los restos A379, Y380, S381, P382, G383, H384, K385 resultaron ser todas insolubles en ausencia de detergente.

La estrategia utilizada para aumentar la solubilidad de la proteína DTR consistió en mutar los restos hidrófobos presentes en la superficie de la proteína por restos hidrófilos, polares o cargados. En efecto, los restos hidrófobos en la superficie de una proteína son potencialmente responsables de una baja solubilidad y una tendencia a la agregación.

- 5 Las mutaciones a introducir se identificaron sobre la base de una modelización molecular. El efecto potencial de las mutaciones sobre la estructura de la proteína se indica en la Tabla III.

Tabla III: Efecto esperado de las mutaciones seleccionadas

Posiciones	Mutaciones	Nota de orden estructural e interacciones
Y380	-	flexible al finalizar el bucle del extremo N, sin enlace de hidrógeno estable
	Y380E	enlace iónico con K385
	Y380K	enlace iónico con E532
P382	-	En un codo de tipo II
	P382T	
Q387	-	En el bucle del extremo N, sin enlace de hidrógeno estable
	Q387E	enlace iónico con Y380K
P388	-	En el bucle del extremo N, justo antes de una hebra beta
	P388T	P388T
L390	-	En una hebra beta
	L390N	donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de Y394
	L390T	resto beta ramificado promovido
A395	-	En una hebra beta
	A395T	resto beta ramificado promovido
N399	-	En un bucle, sin enlace de hidrógeno estable
	N399D	enlace iónico con K419
N424	-	En un bucle, sin enlace de hidrógeno estable
	N424D	enlace iónico con N481K
	N424E	enlace iónico con N481K
	N424K	enlace iónico con E423 o N481E o N481D
P426	-	En el extremo de un bucle
	P426T	
L427	-	En una hebra beta, interacciones de Van der Waals con Y394
	L427K	interacciones de Van der Waals con Y394, donante de enlace de hidrógeno para T425, enlace iónico con E423
	L427R	interacciones de Van der Waals con Y394, donante de enlace de hidrógeno para T425, enlace iónico con E423
P428	-	En un saliente
	P428T	
P476	-	En un saliente
	P476T	
Y478	-	En una hebra beta, interacciones de Van der Waals con P426, P428, P476
	Y478D	

Posiciones	Mutaciones	Nota de orden estructural e interacciones
	Y478N	
N481	-	En un bucle, sin enlace de hidrógeno estable
	N481D	enlace iónico con N424K
	N481E	enlace iónico con N424K
	N481K	enlace iónico con N424E o N424D
V483	-	En un bucle
	V483T	

Se prepararon tres bancos de secuencias de DTR mediante síntesis (Tabla IV). Cada banco contenía secuencias mutadas en 4 o 5 codones seleccionados según los datos de modelización molecular. Cada banco correspondía a codones mutados en una misma región de la secuencia codificante. Las secuencias contenían degeneraciones parciales de los codones a mutar para limitar las mutaciones posibles a los restos hidrófilos potencialmente aceptables según los datos de la modelización (1, 2 o 3 mutaciones posibles por cada posición). La posibilidad de conservar el codón natural se mantuvo en aquellos casos donde la posición estudiada no pudo tolerar mutaciones (Tabla IV), salvo en Y380 donde la posición del extremo N relativamente poco constreñida se considera tolerante.

10 **Tabla IV: Combinaciones de mutaciones posibles alcanzadas en cada uno de los tres bancos de secuencias mutantes generadas para aumentar la solubilidad del dominio R (R1, R2, R3).**

Región mutada	Posiciones mutadas	Restos posibles	Diversidad del banco
R1	Y380	K/E	72
	P382	P/T	
	Q387	Q/E/K	
	P388	P/T	
	L390	L/T/N	
R2	N424	N/K/D/E	48
	P426	P/T	
	L427	L/R/K	
	P428	P/T	
R3	P476	P/T	48
	Y478	Y/N/D	
	N481	N/K/D/E	
	V483	V/T	

*La diversidad indica el número de combinaciones de mutaciones posibles para cada uno de los bancos.

Después de la transfección de los bancos de ADN, cada una de las colonias bacterianas obtenidas correspondientes a una combinación de mutaciones dada se analizó para determinar su capacidad posible para producir una forma mutante soluble de la proteína DTR. Para ello, 740 clones producidos en los tres bancos, que representan el 85 % de la diversidad conseguida (41 clones diferentes para cada banco), se repicaron en placas de 96 pocillos, cultivadas en condiciones de inducción de la expresión de la proteína, se centrifugaron y posteriormente se lisaron con solución de lisis. Tras la centrifugación, la solubilidad de las proteínas expresadas por cada clon se evaluó mediante observación de un aglomerado de cuerpos de inclusión en el fondo del pocillo, opcional, y mediante análisis del sobrenadante mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización y coloración con azul de Coomassie (Figura 1).

El análisis de las colonias llevó a seleccionar los clones que mostraban una ausencia de aglomerado (aglomerado correspondiente a los cuerpos de inclusión) o un aglomerado de tamaño reducido, junto con una elevada cantidad de proteína en el sobrenadante de lisis. Solo el banco R1 permitió generar clones productores de DTR soluble (Figura 1), en número de cinco. Estos clones, denominados 1D3, 1D6, 2C8, 5G5 y 1H3, comprenden secuencias nucleotídicas

que codifican las proteínas SEQ ID NO:2 a 6, respectivamente. Todos los clones eran solubles tras la purificación según el método descrito en el ejemplo 1. El clon 1D6, también denominado G1, que permitió obtener la mayor cantidad de DTR en forma soluble tras su expresión a 30°C, contenía las mutaciones: Y380K/Q387E/L390T.

- 5 El enfoque de modelización llevó a proponer dos mutaciones adicionales, no representadas en el banco R1: A395T y N399D. Cada una de estas dos mutaciones se introdujo en el clon 1D6 (o G1) para investigar un efecto de solubilidad aumentada, lo que ha sido correcto para la mutación A395T (Figura 2).

10 En total, la proteína DTR más soluble, denominada DTR1 (SEQ ID NO:7), contiene las mutaciones: Y380K/Q387E/L390T/A395T

Esto no excluye que otras mutaciones de DTR pudieran mejorar aún más su solubilidad y su producción en *E. coli*.

- 15 La actividad de unión de la proteína DTR1 a HB-EGF se evaluó según su capacidad para inhibir la intoxicación de células Vero por la toxina diftérica y, por tanto, la unión de la toxina a la pro-HB-EGF. Los resultados muestran que DTR1 inhibe la intoxicación de células Vero por la toxina diftérica de forma dependiente de la dosis (Figura 3). El efecto inhibitor de DTR1 se comparó con el de CRM197, del clon 1D6 y DTR_{WT} solubilizado en sarcosilo al 0,5 %. Las K_d estimadas mediante regresión de Schild para las tres interacciones proporcionan los siguientes valores:

20

Tabla V: Afinidad por HB-EGF

proteína	K _d (pM)
DTR1	~ 49
Clon 1D6	~ 25
DTR _{WT} (+ sarcosilo al 0,5 %)	~ 6500
CRM197	~ 3100

- 25 Los experimentos de Biacore en los que el HB-EGF se inmovilizó sobre la microplaca (chip) del aparato y DTR1 se inyectó en la fracción móvil para medir las constantes de asociación y disociación, permitieron confirmar la K_d estimada de CRM197 y mostrar una K_d muy superior para DTR1. Sin embargo, la lentitud de la disociación no permite una medición precisa de la constante de disociación de DTR1 en Biacore. En la continuación del estudio, la afinidad de los mutantes se estimó mediante citotoxicidad y regresión de Schild.

Ejemplo 3: Mejora de sitio de unión de la proteína DTR

- 30 La estructura de la toxina diftérica cuando interactúa con el HB-EGF (Louie et al., Mol. Cell., 1997, 1, 67-78) permite analizar la interfase entre las dos proteínas. Este análisis estructural, junto con experimentos *in silico* de modelización molecular, ha permitido seleccionar 10 mutaciones en el sitio de unión de DTR para aumentar la afinidad de la proteína por HB-EGF. Estas mutaciones estaban destinadas a aumentar la entalpía de la interacción favoreciendo la formación de enlaces de hidrógeno, puentes salinos y/o contactos de Van der Waals entre las dos proteínas. El efecto potencial de las mutaciones seleccionadas sobre la estructura de la proteína se indica en la Tabla VI.

Tabla VI: Notas del orden estructural sobre los restos seleccionados para aumentar la afinidad de la proteína DTR y efecto esperado de las mutaciones

Posiciones	Mutaciones	Nota de orden estructural e interacciones potenciales
F389	-	En una hebra beta, en el límite de la reacción de interacción con HB-EGF, posición para cerca de una molécula de agua de la interfase estructurada y de HB-EGF H139
	F389Y	Donante o aceptor de enlace de hidrógeno para una molécula de agua de la interfase estructurada o HB-EGF H139
H391	-	En una hebra beta, en el límite de la reacción de interacción con HB-EGF, donante del enlace de hidrógeno para HB-EGF E141
	H391K	Enlace iónico con HB-EGF E141
G510	-	En una hebra beta, en el centro de la reacción de interacción con HB-EGF, al lado de una cavidad entre DTR y HB-EGF, frente al grupo CO de la cadena principal de HB-EGF C132

Posiciones	Mutaciones	Nota de orden estructural e interacciones potenciales
	G510A	El cambio más conservativo para rellenar la cavidad y aumentar las interacciones de Van der Waals
	G510M	Cadena lateral hidrófoba flexible para rellenar la cavidad y aumentar las interacciones de Van der Waals
	G510Q	Donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de HB-EGF C132 y/o aceptor de enlace de hidrógeno H para el grupo NH de la cadena principal HB-EGF C134.
	G510S	Cadena lateral pequeña aire para rellenar la cavidad y aumentar las interacciones de Van der Waals
T521	-	En un pseudocodo de tipo II, en el límite de la reacción de interacción con HB-EGF
	T521R	Donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de HB-EGF K111 y/o el grupo CO de la cadena principal de HB-EGF K113
Q515	-	En una hebra beta, en el límite de la reacción de interacción con HB-EGF, donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de HB-EGF L127
	Q515E	En una red de enlaces iónicos y de hidrógeno que involucran K522R, HB-EGF R128, el grupo CO de la cadena principal de HB-EGF R128, el grupo CO de la cadena principal de HB-EGF L127
K522	-	En una hebra beta, en el límite de la reacción de interacción con HB-EGF, donante de enlace de hidrógeno T517
	K522R	En una red de enlaces iónicos y de hidrógeno que involucran Q515E, HB-EGF R128, el grupo CO de la cadena principal de HB-EGF R128, el grupo CO de la cadena principal de HB-EGF L127

Las mutaciones se introdujeron en la proteína DTR1 mediante mutagénesis dirigida (Tabla VII).

Tabla VII: Mutaciones para mejorar la afinidad de unión de DTR al HB-EGF identificadas por modelización molecular y estudiadas experimentalmente

F389Y	G510Q
H391K	G510S
F389Y/ H391K	T521R
G510A	Q515E/K522R
G510M	F389Y/H391K/Q515E/K522R

Las proteínas se expresaron en *E. coli*. Se estudiaron para determinar su capacidad de inhibir la unión de la toxina diftérica a la pro-HB-EGF según el ensayo de citotoxicidad descrito en el ejemplo 1. La Figura 4A muestra la capacidad de cada mutante para inhibir o no la toxicidad de la toxina diftérica en células Vero. Los resultados muestran que solamente los mutantes F389Y y G510A inhiben de forma importante la toxicidad de la toxina diftérica. La introducción de estas dos mutaciones en DTR1 conlleva un efecto acumulativo (Figura 4B).

El mutante más activo, que corresponde a la proteína DTR1 que contiene las mutaciones F389Y y G510A se denominó DTR3 (SEQ ID NO:8). Su afinidad de unión al HB-EGF se evaluó por la capacidad de dosis crecientes de DTR3 para inhibir el efecto tóxico de dosis crecientes de toxina diftérica en células Vero como se describe en el ejemplo 2. La Kd estimada por regresión de Schild a partir de los datos de CE50 de las curvas de inhibición se presenta en la Tabla VIII.

Tabla VIII: Afinidad por HB-EGF

Proteína	Kd (pM)
DTR3	~ 9,5

Este valor sugiere que DTR3 es al menos 300 veces más afín que CRM197 para HB-EGF y 5 veces más afín que DTR1.

Ejemplo 4: Disminución de la inmunogenicidad de la proteína DTR por supresión de los principales epítomos T CD4

La capacidad de 25 péptidos solapantes que abarcan la totalidad de la secuencia de DTR_{WT} para activar los linfocitos T CD4 específicos se estudió mediante ELISPOT, en experimentos de inmunización *in vitro* a partir de linfocitos T CD4 y de células dendríticas purificadas de la sangre de 7 donantes sanos, de edades y fenotipos HLA-DRB1 diferentes.

Los resultados muestran que la respuesta inmunitaria contra la proteína DTR_{WT} está dirigida principalmente contra cinco regiones epitópicas que abarcan el 60 % de la proteína y contra las cuales al menos el 71 % de los donantes han mostrado respuesta, es decir, 5 donantes en 7 estudiados (Tabla IX):

- la región L₄₂₇-L₄₄₁ (Péptido 9) contra la que se han detectado linfocitos T CD4 específicos para la totalidad de los donantes estudiados con una amplitud elevada (51 líneas entre 230 líneas cribadas, es decir, un 22 %),
- las regiones H₃₉₁-Q₄₁₁ / S₄₅₁-D₄₆₅ / S₄₇₅-N₅₀₂ (Péptidos 3-4, 13 y 17-18-19 respectivamente) contra las que se han detectado, de una forma global, linfocitos T CD4 específicos para el 86 % de los donantes (es decir, 6 donantes/7) con una amplitud un poco más moderada que para la región anteriormente descrita (20 a 30 líneas de linfocitos T CD4 específicos, es decir, 8,5 a 13 %), y
- la región S₅₀₆-H₅₂₀ (péptido 22) contra la que se han detectado linfocitos T CD4 específicos se detectaron en el 71 % de los donantes con una amplitud del 8 %.

Tabla IX: Balance, por péptido y donante, de las líneas de linfocitos T CD4 específicos de la proteína DTR

Donantes	P668	P661	P659	P663	P664	P667	P658	Núm.* total líneas TCD4	
HLA-DRB1	DR3 DR13	DR1 DR11	DR13 DR7	DR4 DR11	DR1 DR4	DR8 DR15	DR3 DR7	Frecuencia de respondedores	
Péptidos/Edad	52	44	29	62	57	44	30		
1	378-392		1				1	1	14
2	385-399	1		4		2	7		43
3	391-405	1	3	2	1		4	11	71
4	397-411	1	3	1	1	13	8	27	86
5	403-417				1		1	1	14
6	409-423	1			6		7		29
7	415-429						1	1	14
8	421-435	1				1	2		29
9	427-441	3	3	5	3	13	4	20	51
10	433-447	1		2		1	18	22	100
11	439-453	2	2				1	5	57
12	445-459	9		5			3	17	43
13	451-465	9		14	1	2	3	1	30
14	457-471		2	1			1	4	86
15	463-477						10	10	43
16	469-483	2	1				3		14
17	475-489	7	2	8	5		1	21	29
18-19	482-502	4	1	5	4		1	3	71
20	494-508			2			2	4	86
21	500-514			1	1		4	6	29
22	506-520	1		2	6	4	5	18	43
									71

Donantes		P668	P661	P659	P663	P664	P667	P658	Núm.* total líneas TCD4	
HLA-DRB1	Péptidos/Edad	DR3	DR1	DR13	DR4	DR1	DR8	DR3	Frecuencia de respondedores	
		DR13	DR11	DR7	DR11	DR4	DR15	DR7		
		52	44	29	62	57	44	30		
23	512-526				3	2		5		29
24	518-532			2			1	3		29
25	521-535			1				1		14
Total		27	16	44	23	28	30	40		
%		30	13	49	19	31	33	44		
*Número total de líneas de linfocitos T CD4 específicos de un péptido entre las 230 líneas cribadas										

Habiéndose identificado 5 regiones epitópicas, es posible prever la mutación de estos epítomos para reducir su unión a las moléculas HLA-II. Se utilizó el servidor ProPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>) para predecir, en el interior de estas cinco regiones de DTR_{WT}, las secuencias capaces de unir los 8 alelos HLA de clase II más habituales entre la población (Tabla X). El mismo análisis aplicado a las secuencias mutadas de DTR1 muestra que las mutaciones introducidas para mejorar la solubilidad de DTR disminuyen la inmunogenicidad de la proteína (epítomos previstos para la región 378-403). En efecto, el epítomo previsto para unir DRB1_0301 desaparece, y uno de los epítomos previstos para unir DRB1_0401 aumenta su umbral, es decir, disminuye su afinidad prevista por la molécula de HLA.

10

Tabla X. Predicción de las secuencias capaces de unir los 8 alelos HLA de clase II más habituales (DRB1_0101, DRB1_0301, DRB1_0401, DRB1_0701, DRB1_1101, DRB1_1301, DRB1_1501, DRB5_0101) en el interior de las 5 regiones identificadas como inmunógenas según el ensayo de activación de linfocitos T CD4. Las secuencias peptídicas corresponden a las secuencias SEQ ID NO: 43 a 109. La segunda columna de la tabla proporciona la región estudiada. La primera columna indica las mutaciones propuestas para inhibir la unión de las secuencias previstas a las moléculas HLA de clase II. Las columnas siguientes indican, para cada alelo HLA considerado, la presencia o ausencia de secuencia capaz de unir esta molécula HLA. Cada secuencia está precedida de un valor umbral que refleja la intensidad de unión: 1/2 (unión fuerte), 3/4 (unión media), 5/6 (unión débil). Los restos en negrita corresponden a las mutaciones propuestas para eliminar la unión de las secuencias al alelo HLA considerado.

Variante	Secuencia (378-403)	DRB1_0101	DRB1_0301	DRB1_0401	DRB1_0701	DRB1_1101	DRB1_1301	DRB1_1501	DRB5_0101
WT	MGYSPGHK-TQPFLH-DGYAVSWNTVED		6:FLHDGYAVS	3:FLHDGYAVS 5:YAVSWNTVE					
DTR1	MGKSPGHK-TEPFTH-DGYTVSWNTVED			5:FTHDGYTVS 5:YTVSWNTVE					
Variante	Secuencia (391-411)	DRB1_0101	DRB1_0301	DRB1_0401	DRB1_0701	DRB1_1101	DRB1_1301	DRB1_1501	DRB5_0101
DTR1	HDGYTVSWNTVEDSI-IRTGFQ			4:VSWNTVEDS 5:YTVSWNTVE	6:WNTVEDSII				
N399K	HDGYTVSWKTVEDSI-IRTGFQ				5:WKTVEDSII		6:VSWKTVEDS		
V401Q	HDGYTVSWNTQEDSI-IRTGFQ			5:YTVSWNTQE					
N399K V401Q	HDGYTVSWKTQEDSI-IRTGFQ								
Variante	Secuencia (427-441)	DRB1_0101	DRB1_0301	DRB1_0401	DRB1_0701	DRB1_1101	DRB1_1301	DRB1_1501	DRB5_0101
DTR1	LPIAGVLLP-TIPGKL	-	6:VLLPTIPGK	-	3:LLPTIPGKL	3:LPIAGVLLP	4:LPIAGVLLP	-	2:LLPTIPGKL

Variante	Secuencia (378-403)	DRB1_0101	DRB1_0301	DRB1_0401	DRB1_0701	DRB1_1101	DRB1_1301	DRB1_1501	DRB5_0101
L427Q	QPIAGVLLP-TIPGKL	-	6:VLLPTIPGK	-	3:LLPTIPGKL	-	-	-	2:LLPTIPGKL
T436K	LPIAGVLLP-KIPGKL	-	6:VLLPKIPGK	-	-	3:LPIAGVLLP	4:LPIAGVLLP	-	-
L427Q T436K	QPIAGVLLP-KIPGKL	-	6:VLLPKIPGK	-	-	-	-	-	-
Variante	Secuencia (451-465)	DRB1_0101	DRB1_0301	DRB1_0401	DRB1_0701	DRB1_1101	DRB1_1301	DRB1_1501	DRB5_0101
DTR1	SVNGRKIR-MRCRAID	-	3:IRMRCRAID	-	-	3:IRMRCRAID	1:VNGRKIRMIR 1:IRMRCRAID	4:IRMRCRAID	-
I457D	SVNGRK-DRMRCRAID	-	-	-	-	-	-	-	-
I457E	SVNGRKIR-MRCRAID	-	-	-	-	-	-	-	-
V452T	STNGRKIR-MRCRAID	-	3:IRMRCRAID	-	-	3:IRMRCRAID	1:IRMRCRAID	4:IRMRCRAID	-
R460T	SVNGRKIR-MTCRAID	-	3:IRMTCAID	-	-	3:IRMTCAID	3:VNGRKIRMT 3:IRMTCAID	6:IRMTCAID	-
A463D	SVNGRKIR-MRCRDID	-	5:IRMRCRDID	-	-	-	1:VNGRKIRMIR 3:IRMRCRDID	-	-
V452T R460T	STNGRKIR-MTCRDID		5:IRMTCRDID						
A463D									
DTR1	SPVY-VGNGVHAN- LHVAF- HRSSSEKIHSN	3:YVGNGVHAN 3:FHRSSSEKI 4:YVGNGVHA		1:YVGNGVHAN 1:FHRSSSEKI	1:FHRSSSEKI	2:YVGNGVHAN 5:LHVAFHRSS	1:LHVAFHRSS 4:YVGNGVHAN		

Variante	Secuencia (378-403)	DRB1_0101	DRB1_0301	DRB1_0401	DRB1_0701	DRB1_1101	DRB1_1301	DRB1_1501	DRB5_0101
Y478T	SPVTVGNGVHANLH- VAF-HRSSSEKIH-SN	3:FHRSSSEKI		1:FHRSSSEKI	1:FHRSSSEKI	5:LHVAFHRSS	1:LHVAFHRSS		
V483D	SPVY-VGNGDHAN- LHVAF- HRSSSEKIH-SN	3:FHRSSSEKI		1:FHRSSSEKI 5:YVVGNGDHAN	1:FHRSSSEKI	5:LHVAFHRSS	1:LHVAFHRSS		
V483E	SPVY-VGNGEHAN- LHVAF- HRSSSEKIH-SN	3:FHRSSSEKI		1:FHRSSSEKI	1:FHRSSSEKI	5:LHVAFHRSS	1:LHVAFHRSS		
V483H	SPVYVGNG-HHANLH- VAF-HRSSSEKIH-SN	3:FHRSSSEKI 5:YVVGNGHHA		1:FHRSSSEKI	1:FHRSSSEKI	5:YVVGNGHHA 5:LHVAFHRSS	1:LHVAFHRSS	6:YVVGNGHHA	
V483Q	SPVY-VGNGQHAN- LHVAF- HRSSSEKIH-SN	3:FHRSSSEKI S:YVVGNGQHA 6:YVVGNGQHAN		1:FHRSSSEKI	1:FHRSSSEKI	S:YVVGNGQHAN 5:LHVAFHRSS	1:LHVAFHRSS		
A490G	SPVY-VGNGVHAN- LHVGF- HRSSSEKIH-SN	3:YVVGNGVHAN 3:FHRSSSEKI 4:YVVGNGVHA		1:YVVGNGVHAN 1:FHRSSSEKI 6:VGFHRSSSE	1:FHRSSSEKI	2:YVVGNGVHAN	4:YVVGNGVHAN S:LHVGFHRSS		

Variante	Secuencia (378-403)	DRB1_0101	DRB1_0301	DRB1_0401	DRB1_0701	DRB1_1101	DRB1_1301	DRB1_1501	DRB5_0101
H492E	SPVY-VGNGVHAN-LH- VAFERSSEKIHSN	3:YVGNVGVHAN 4:VYVGNVGVHA 5:FERSSSEKI		1:YVGNVGVHAN 2:FERSSSEKI	1:FERSSSEKI	2:YVGNVGVHAN 5:LHVAFHRKS	4:YVGNVGVHAN S:LHVAFERS		
S494K	SPVY-VGNGVHAN- LHVAF- HRKSSEKIHSN	3:YVGNVGVHAN 4:VYVGNVGVHA		1:YVGNVGVHAN S:FHRKSSEKI	2:FHRKSSEKI	2:YVGNVGVHAN 5:LHVAFHRKS 4:VAFHRKSSE	1:LHVAFHRKS 4:YVGNVGVHAN 4:VAFHRKSSE		
S496K	SPVY-VGNGVHAN- LHVAF- HRSSSEKIHSN	3:YVGNVGVHAN 4:VYVGNVGVHA	4:FHRSSSEKI	1:YVGNVGVHAN	1:FHRSSSEKI	2:YVGNVGVHAN 5:LHVAFHRSS S:FHRSSSEKI	1:LHVAFHRSS 4:YVGNVGVHAN		
Y478T A490G H492E S494K S496K	SPVTVGNGVHANLH- VGFERK-SKEKIHSN								
Variante	Secuencia (506-520)	DRB1_0101	DRB1_0301	DRB1_0401	DRB1_0701	DRB1_1101	DRB1_1301	DRB1_1501	DRB5_0101
DTR1	SDSIGV-LGYQKTVVDH	-	-	1:LG YQKTVVDH	-	6:LG YQKTVVDH	S:LG YQKTVVDH	-	-
T517D	SDSIGV-LGYQKD- VDH								
T517E	SDSIGV-LGYQKEVDH								

La predicción de los restos de anclaje de las secuencias previstas para unir las moléculas HLA de clase II permitió proponer una serie de mutaciones indicadas en negrita en la Tabla X, destinadas a suprimir epítomos T potenciales. Las mutaciones se seleccionaron para evitar una desestabilización potencial de la proteína, lo que se estudió *in silico* mediante modelización molecular. Cualquier mutación que afecte el sitio de unión al HB-EGF quedó excluida. El efecto

5

Tabla XI: Notas de orden estructural sobre los restos seleccionados para suprimir los epítomos T CD4 de la proteína DTR y efecto esperado de las mutaciones

Posiciones	Mutaciones	Nota de orden estructural e interacciones potenciales
N399	-	Expuesto al disolvente, en un bucle, sin enlace de hidrógeno estable
	N399K	Enlace iónico con D417 y donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de N486.
V401	-	Expuesto al disolvente, en un codo de tipo I
	V401Q	Aceptor de enlace de hidrógeno para K385
L427	-	Parcialmente enterrado, en una hebra beta, interacciones de Van der Waals con Y394
	L427Q	donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de D392, cadena lateral de hidrocarburo que establece interacciones de Van der Waals con Y394
T436		Parcialmente enterrado, en un bucle, donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de G466, interacciones de Van der Waals con V443
	T436H	Aceptor de enlace de hidrógeno para T469, interacciones de Van der Waals con V443
	T436K	Enlace iónico con A463D
I457	-	Enterrado en gran medida; en una hebra beta; interacciones de Van der Waals con I450, V452, P473, V477
	I457D	Aceptor de enlace de hidrógeno para S475, el grupo NH de la cadena principal de S475, el grupo NH de la cadena principal de K474
	I457E	Aceptor de enlace de hidrógeno para S475, el grupo NH de la cadena principal de S475, el grupo NH de la cadena principal de K474, o el grupo NH de la cadena principal de V452
V452	-	Parcialmente enterrado, en una hebra beta, interacciones de Van der Waals de un grupo metilo de la cadena secundaria con I450, I457, V477
	V452T	interacciones de Van der Waals del grupo metilo de la cadena secundaria con I450, I457, V477
A463	-	Expuesto al disolvente, en una hebra beta
	A463D	Enlace iónico con T436K
R460	-	Expuesto al disolvente, en una hebra beta, forma parte de un parche
		básico que contiene otras argininas que posiblemente interactúan con grupos de heparán sulfato unidos a la membrana plasmática, cerca de HB-EGF, donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de P473
	R460T	Resto betarramificado
Y478	-	Expuesto al disolvente, en una hebra beta, interacciones de Van der Waals con P426, P428, P476

Posiciones	Mutaciones	Nota de orden estructural e interacciones potenciales
	Y478T	Resto betarramificado
V483	-	Expuesto al disolvente, en un bucle
	V483D	
	V483E	aceptor de enlace de hidrógeno para V452T, N453
	V483H	donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de Y478
	V483Q	aceptor o donante de enlace de hidrógeno para V452T, donante de enlace de hidrógeno para el grupo CO de la cadena principal de Y478
A490	-	Parcialmente enterrado, en una hebra beta
	A490G	
H492	-	Expuesto al disolvente, en una hebra beta, aceptor o donante de enlace de hidrógeno para S494
	H492E	Enlace iónico con S494K
S494	-	Expuesto al disolvente, en un bucle, aceptor de enlace de hidrógeno para H492
	S494K	Enlace iónico con H492E
S496	-	Expuesto al disolvente, en un bucle
	S496K	Donante de enlace de hidrógeno para Q411
T517	-	Expuesto al disolvente, en una hebra beta, aceptor de enlace de hidrógeno para K522
	T517D	Enlace iónico con K522
	T517E	Enlace iónico con K522

Las mutaciones indicadas en la Tabla XII se introdujeron de forma individual o a veces en combinación en la secuencia de la proteína DTR3, según los datos de modelización, y posteriormente se acumularon progresivamente cuando no alteraban ni la producción de la proteína recombinante, ni su actividad biológica. La actividad biológica de los mutantes se estudió por inhibición de la toxicidad de la toxina diftérica en células Vero.

5

Tabla XII: Mutaciones introducidas en DTR3 para suprimir los epítomos T CD4.

N399K	A463S	H492E
V401Q	A463E	S494K
L427Q	A463D	S496K
L427N	A463G	H492E/S494K
L427S	T436K/A463D	H492E/S496K
T436K	V452T/R460T/A463D	S494K/S496K
T436H	Y478T	H492E/S494K/S496K
V452T	V483D	E497D
I457D	V483E	T436H/E497D
I457E	V483H	T517D
R460T	V483Q	T517E

A463T	A490G	
* En su conjunto, las mutaciones no afectan de manera importante la expresión y la actividad de la proteína, que por tanto se han retenido.		

Estos experimentos permitieron retener con éxito las siguientes mutaciones: N399K, V452T, T517E, V483Q, H492E, S494K, T436H y E497D

- 5 La proteína derivada de DTR3 y que acumula las mutaciones N399K, V452T, T517E, V483Q, H492E y S494K se denomina DTR8 (SEQ ID NO:9); tiene un PM de 17458 Da. Estas mutaciones han permitido eliminar 10 de los 26 epítotos T CD4 identificados en DTR_{WT} (Tabla XIII).

Tabla XIII: Comparación del número y fortaleza de unión a HLA II de los epítotos T CD4 entre DTR_{WT} y DTR8

10

DTR	Intensidad de unión a HLA II	Valor umbral que refleja la intensidad de unión	Epítotos T CD4					
			391-411	427-441	451-465	475-502	506-520	Número total
DTR _{WT}	Fuerte	1	0	0	2	4	1	7
		2	0	1	0	1	0	2
	Promedio	3	0	2	2	2	0	6
		4	1	1	1	2	0	5
	Débil	5	1	0	0	1	1	
		6	1	1	0	0	1	3
		Total	3	5	5	10	3	26
DTR8	Fuerte	1	0	0	1	0	0	1
		2	0	1	0	0	0	1
	Promedio	3	0	2	2	1	0	5
		4	0	1	1	0	0	2
	Débil	5	1	0	0	3	0	4
		6	1	1	0	1	0	
		Total	2	5	4	5	n	16

Entre estos 10 epítotos, se encuentran 7 de los 9 epítotos previstos como inmunodominantes de DTR_{WT}. La capacidad de la proteína resultante, DTR8, para inducir una respuesta inmunitaria de tipo CD4, es decir, productora de anticuerpos, se encuentra por tanto considerablemente disminuida con respecto a la de DTR_{WT} en su forma natural.

15

DTR8 contiene seis mutaciones más que DTR3. Puesto que cualquier mutación y combinación de mutaciones es susceptible de alterar la función de una proteína, es necesario evaluar el efecto de estas mutaciones adicionales sobre la afinidad de unión de DTR por HB-EGF. La actividad de unión de la proteína DTR8 a HB-EGF se evaluó según su capacidad para inhibir la intoxicación de células Vero por la toxina diftérica y, por tanto, la unión de la toxina a la pro-HB-EGF. Los resultados (Figura 5) muestran que DTR8 inhibe la intoxicación de células Vero por la toxina diftérica de forma dependiente de la dosis. El efecto inhibitorio de DTR8 se comparó con el de CRM197, DTR_{WT} solubilizado en sarcosilo al 0,5 %, DTR3 y DTR1 (Figura 3). Las K_d estimadas mediante regresión de Schild para las cuatro interacciones proporcionan los siguientes valores (Tabla XIV):.

20

Tabla XIV: Afinidad de las proteínas por el HB-EGF

Proteína	K _d (pM)
DTR8	2,2
DTR3	9,5
DTR1	49
DTR _{WT} (+ sarcosilo al 0,5 %)	6500
CRM197	3100

De forma notable e inesperada, la adición de las seis mutaciones destinadas a reducir la inmunogenicidad de DTR ha contribuido a aumentar su afinidad por HB-EGF. En total, DTR8 es aproximadamente 1400 veces más afín por HB-EGF que CRM197.

25

La actividad de unión de la proteína DTR8 al HB-EGF también se evaluó por su capacidad para inhibir la unión del HB-EGF al EGFR en una línea de células Ba/F3 transfectadas con el gen del EGFR y dependientes del HB-EGF para su crecimiento. Los resultados (Figura 6) muestran que DTR8 inhibe la proliferación de las células dependiente del HB-EGF de forma dependiente de la dosis. El efecto inhibitorio de DTR8 se comparó con el de CRM197 (Figura 6). Los resultados muestran que se necesita al menos 300 veces más de CRM197 para obtener un efecto inhibitorio equivalente. En consecuencia, DTR8 es al menos 300 veces más eficaz que CRM197 para unirse al HB-EGF en solución.

En conclusión, estos resultados muestran que la proteína DTR8 es capaz de unirse a las moléculas pro-HB-EGF en la superficie de las células (Figura 5) y alHB-EGF en solución (Figura 6) y de bloquear su actividad biológica. La estimación de las Kd de las interacciones sugiere que DTR8 es 1400 veces más fuerte que CRM197 para unirse alHB-EGF.

Ejemplo 5: Evaluación de la antigenicidad de las proteínas DTR1 y DTR8

La población occidental está vacunada contra la toxina diftérica. Los individuos que podrían beneficiarse de un tratamiento con una proteína terapéutica de tipo DTR8 podrían presentar, de esta forma, anticuerpos capaces de reaccionar contra la misma. La capacidad de los sueros de 20 donantes sanos para reconocer la toxina diftérica (en su forma mutada CRM197), los diferentes dominios (catalítico (C), de translocación (T) y DTR (en la forma mutada, DTR1 soluble)) se comparó con la proteína DTR8, mediante ELISA (Figura 7). Un título de anticuerpos ≤ 20 corresponde al ruido de fondo del ensayo y, por tanto, a una ausencia de reconocimiento. De forma arbitraria, se fijó un umbral del título de 30 para distinguir entre los sueros que presentaban una respuesta débil o fuerte.

Los resultados (Figura 7) muestran que 16/20 donantes tienen anticuerpos contra la toxina diftérica. 14/20 donantes presentan una respuesta de anticuerpos media a fuerte. Sin embargo, la mayoría de los anticuerpos presentes en cada suero, tomados en cuenta por separado, se dirigen contra el dominio C de la toxina (Figura 7). En efecto, 12 sueros muestran una respuesta superior al umbral (respuesta media a fuerte) y 4 sueros presentan una respuesta por debajo del umbral (respuesta débil). Si se tiene en cuenta la reactividad de los sueros contra la forma soluble del dominio R (DTR1), 15/20 sueros reconocen el dominio R. Sin embargo, solo 7 sueros muestran una respuesta por encima del umbral (respuesta media a fuerte). De forma notable, la proteína DTR8 es considerablemente menos bien reconocida por los sueros de los donantes que la DTR1. En efecto, solo 3/20 sueros muestran una reactividad de media a fuerte contra DTR8 y 2 sueros presentan una reactividad baja (Figura 7).

En conclusión, estos resultados muestran que la antigenicidad de la proteína DTR8 es débil y está considerablemente reducida con respecto a la de CRM197. Esta antigenicidad también está reducida con respecto a la de la proteína DTR1, correspondiente a la forma soluble de DTR que contiene el menor número de mutaciones. En otras palabras, las mutaciones introducidas en DTR para aumentar su afinidad por HB-EGF y disminuir su inmunogenicidad contribuyen a reducir considerablemente su antigenicidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> COMISARIADO DE ENERGÍA ATÓMICA Y DE ENERGÍAS ALTERNATIVAS

<120> Inhibidor del HB-EGF derivado del dominio R de la toxina diftérica para el tratamiento de enfermedades asociadas a la activación de la ruta HB-EGF/EGFR

<130> 263FR495

<160> 109

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 535

<212> PRT

<213> Corynebacterium diphtheriae

<400> 1

ES 2 679 168 T3

Gly 1	Ala	Asp	Asp	Val 5	Val	Asp	Ser	Ser	Lys 10	Ser	Phe	Val	Met	Glu 15	Asn
Phe	Ser	Ser	Tyr 20	His	Gly	Thr	Lys	Pro 25	Gly	Tyr	Val	Asp	Ser 30	Ile	Gln
Lys	Gly	Ile 35	Gln	Lys	Pro	Lys	Ser 40	Gly	Thr	Gln	Gly	Asn 45	Tyr	Asp	Asp
Asp	Trp 50	Lys	Gly	Phe	Tyr	Ser 55	Thr	Asp	Asn	Lys	Tyr 60	Asp	Ala	Ala	Gly
Tyr 65	Ser	Val	Asp	Asn	Glu 70	Asn	Pro	Leu	Ser	Gly 75	Lys	Ala	Gly	Gly	Val 80
Val	Lys	Val	Thr	Tyr 85	Pro	Gly	Leu	Thr	Lys 90	Val	Leu	Ala	Leu	Lys 95	Val
Asp	Asn	Ala	Glu 100	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu 105	Leu	Gly	Leu	Ser	Leu 110	Thr	Glu
Pro	Leu	Met 115	Glu	Gln	Val	Gly	Thr 120	Glu	Glu	Phe	Ile	Lys 125	Arg	Phe	Gly
Asp	Gly 130	Ala	Ser	Arg	Val	Val 135	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe 140	Ala	Glu	Gly	Ser
Ser 145	Ser	Val	Glu	Tyr	Ile 150	Asn	Asn	Trp	Glu	Gln 155	Ala	Lys	Ala	Leu	Ser 160
Val	Glu	Leu	Glu	Ile	Asn	Phe	Glu	Thr	Arg	Gly	Lys	Arg	Gly	Gln	Asp

ES 2 679 168 T3

165										170					175				
Ala	Met	Tyr	Glu	Tyr	Met	Ala	Gln	Ala	Cys	Ala	Gly	Asn	Arg	Val	Arg				
			180					185					190						
Arg	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Cys	Ile	Asn	Leu	Asp	Trp	Asp	Val				
		195					200					205							
Ile	Arg	Asp	Lys	Thr	Lys	Thr	Lys	Ile	Glu	Ser	Leu	Lys	Glu	His	Gly				
	210					215						220							
Pro	Ile	Lys	Asn	Lys	Met	Ser	Glu	Ser	Pro	Asn	Lys	Thr	Val	Ser	Glu				
225					230					235					240				
Glu	Lys	Ala	Lys	Gln	Tyr	Leu	Glu	Glu	Phe	His	Gln	Thr	Ala	Leu	Glu				
				245					250						255				
His	Pro	Glu	Leu	Ser	Glu	Leu	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Asn	Pro	Val				
			260					265					270						
Phe	Ala	Gly	Ala	Asn	Tyr	Ala	Ala	Trp	Ala	Val	Asn	Val	Ala	Gln	Val				
		275					280					285							
Ile	Asp	Ser	Glu	Thr	Ala	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Thr	Thr	Ala	Ala	Leu				
	290					295					300								
Ser	Ile	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Ser	Val	Met	Gly	Ile	Ala	Asp	Gly	Ala				
305					310					315				320					
Val	His	His	Asn	Thr	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Gln	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser				
				325					330					335					
Ser	Leu	Met	Val	Ala	Gln	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Glu	Leu	Val	Asp				
			340					345					350						
Ile	Gly	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	Phe	Val	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Leu	Phe				
		355					360					365							
Gln	Val	Val	His	Asn	Ser	Tyr	Asn	Arg	Pro	Ala	Tyr	Ser	Pro	Gly	His				
						375					380								
Lys	Thr	Gln	Pro	Phe	Leu	His	Asp	Gly	Tyr	Ala	Val	Ser	Trp	Asn	Thr				
385					390					395				400					
Val	Glu	Asp	Ser	Ile	Ile	Arg	Thr	Gly	Phe	Gln	Gly	Glu	Ser	Gly	His				
				405					410					415					

ES 2 679 168 T3

Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val
420 425 430

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr
435 440 445

His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile
450 455 460

Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly
465 470 475 480

Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
485 490 495

Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu
500 505 510

Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser
515 520 525

Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
530 535

- 5 <210> 2
<211> 158
<212> PRT
<213> secuencia artificial
- 10 <220>
<223> proteína sintética (variante de DTR Y380K/L390T codificada por el clon 1D3)
- <400> 2

ES 2 679 168 T3

Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Thr His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
20 25 30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
35 40 45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65 70 75 80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
85 90 95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
100 105 110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
115 120 125

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr
130 135 140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145 150 155

<210> 3

<211> 158

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína sintética (variante de DTR Y380K/Q387E/L390T codificada por el clon 1D6)

<400> 3

ES 2 679 168 T3

Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Phe Thr His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
20 25 30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
35 40 45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65 70 75 80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
85 90 95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
100 105 110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
115 120 125

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr

130 135 140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145 150 155

<210> 4

<211> 158

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína sintética (variante de DTR Y380K/Q387E/P388T/L390T codificada por el clon 2C8)

<400> 4

ES 2 679 168 T3

```

Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Thr Phe Thr His Asp Gly
1      5      10      15

Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
      20      25      30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
      35      40      45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
      50      55      60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65      70      75      80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
      85      90      95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
      100      105      110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
      115      120      125

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr
      130      135      140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145      150      155

```

<210> 5

<211> 158

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína sintética (variante de DTR Y380K/P382T/Q387E/L390T codificada por el clon 2G5)

<400> 5

ES 2 679 168 T3

Met Gly Lys Ser Thr Gly His Lys Thr Glu Pro Phe Thr His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
20 25 30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
35 40 45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65 70 75 80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
85 90 95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
100 105 110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
115 120 125

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr
130 135 140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145 150 155

<210> 6

<211> 158

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína sintética (variante de DTR Y380E/P382T/Q387K/L390T codificada por el clon 1H3)

<400> 6

Met Gly Glu Ser Thr Gly His Lys Thr Lys Pro Phe Thr His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
20 25 30

ES 2 679 168 T3

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
35 40 45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65 70 75 80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
85 90 95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
100 105 110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
115 120 125

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr
130 135 140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145 150 155

<210> 7

<211> 158

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> proteína sintética (variante de DTR Y380K/Q387E/L390T/A395T denominada como DTR1)

<400> 7

Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Phe Thr His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
20 25 30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
35 40 45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65 70 75 80

ES 2 679 168 T3

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
85 90 95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
100 105 110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
115 120 125

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr
130 135 140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145 150 155

<210> 8

<211> 158

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína sintética (variante de DTR Y380K/Q387E/F389Y/L390T/A395T/G510A denominada como DTR3)

<400> 8

Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Tyr Thr His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
20 25 30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
35 40 45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65 70 75 80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
85 90 95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
100 105 110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
115 120 125

Ser Asp Ser Ile Ala Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr
130 135 140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145 150 155

<210> 9

<211> 158

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> proteína sintética (variante de DTR

Y380K/Q387E/F389Y/L390T/A395T/N399K/V452T/V483Q/H492E/S494K/G510A /T517E denominada como DTR8)

<400> 9

Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Tyr Thr His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Val Ser Trp Lys Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
20 25 30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
35 40 45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Thr Asn Gly Arg Lys Ile
65 70 75 80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
85 90 95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Gln His Ala Asn Leu His Val
100 105 110

Ala Phe Glu Arg Lys Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
115 120 125

Ser Asp Ser Ile Ala Val Leu Gly Tyr Gln Lys Glu Val Asp His Thr
130 135 140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145 150 155

<210> 10

<211> 477

<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>
<223> polinucleótido sintético (secuencia codificante optimizada para DTR1)

<220>

<221 > CDS <222> (1)..(474)

<400> 10

atg ggc aaa agc ccg ggt cat aaa acc gag ccg ttt acc cat gat ggc	48
Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Phe Thr His Asp Gly	
1 5 10 15	
tat acc gtg agc tgg aac acc gtg gaa gat agc att att cgt acc ggc	96
Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly	
20 25 30	
ttt cag ggc gaa agc ggc cat gat att aaa att acc gcg gaa aac acc	144
Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr	
35 40 45	
ccg ctg ccg att gcg ggt gtt ctg ctg ccg acc att ccg ggc aaa ctg	192
Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu	
50 55 60	
gat gtg aac aaa agc aaa acc cat att agc gtg aac ggc cgt aaa att	240
Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile	
65 70 75 80	
cgt atg cgt tgc cgt gcg att gat ggt gat gtg acc ttt tgc cgt ccg	288
Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro	
85 90 95	
aaa agc ccg gtg tat gtg ggc aac ggc gtg cat gcg aac ctg cat gtg	336
Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val	
100 105 110	
gcg ttt cat cgt agc agc agc gaa aaa atc cat agc aac gaa att agc	384
Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser	
115 120 125	
agc gat agc att ggc gtg ctg ggc tat cag aaa acc gtg gat cat acc	432
Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr	
130 135 140	
aaa gtg aac tct aaa ctg agc ctg ttc ttc gaa atc aaa agc tga	477
Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser	
145 150 155	

<210> 11
<211> 158
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> Construcción sintética

<400> 11

Met	Gly	Lys	Ser	Pro	Gly	His	Lys	Thr	Glu	Pro	Phe	Thr	His	Asp	Gly
1				5					10					15	
Tyr	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Thr	Val	Glu	Asp	Ser	Ile	Ile	Arg	Thr	Gly
			20					25					30		
Phe	Gln	Gly	Glu	Ser	Gly	His	Asp	Ile	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Asn	Thr
		35					40					45			
Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Thr	Ile	Pro	Gly	Lys	Leu
	50					55					60				
Asp	Val	Asn	Lys	Ser	Lys	Thr	His	Ile	Ser	Val	Asn	Gly	Arg	Lys	Ile
65					70					75				80	
Arg	Met	Arg	Cys	Arg	Ala	Ile	Asp	Gly	Asp	Val	Thr	Phe	Cys	Arg	Pro
				85					90					95	
Lys	Ser	Pro	Val	Tyr	Val	Gly	Asn	Gly	Val	His	Ala	Asn	Leu	His	Val
			100					105					110		
Ala	Phe	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Glu	Lys	Ile	His	Ser	Asn	Glu	Ile	Ser
		115					120					125			
Ser	Asp	Ser	Ile	Gly	Val	Leu	Gly	Tyr	Gln	Lys	Thr	Val	Asp	His	Thr
	130					135					140				
Lys	Val	Asn	Ser	Lys	Leu	Ser	Leu	Phe	Phe	Glu	Ile	Lys	Ser		
145					150					155					

<210> 12

<211> 477

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polinucleótido sintético (secuencia codificante optimizada para DTR3)

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(474)

15 <400> 12

ES 2 679 168 T3

atg ggc aaa agc ccg ggt cat aaa acc gag ccg tat acc cat gat ggc	48
Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Tyr Thr His Asp Gly	
1 5 10 15	
tat acc gtg agc tgg aac acc gtg gaa gat agc att att cgt acc ggc	96
Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly	
20 25 30	
ttt cag ggc gaa agc ggc cat gat att aaa att acc gcg gaa aac acc	144
Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr	
35 40 45	
ccg ctg ccg att gcg ggt gtt ctg ctg ccg acc att ccg ggc aaa ctg	192
Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu	
50 55 60	
gat gtg aac aaa agc aaa acc cat att agc gtg aac ggc cgt aaa att	240
Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile	
65 70 75 80	
cgt atg cgt tgc cgt gcg att gat ggt gat gtg acc ttt tgc cgt ccg	288
Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro	
85 90 95	
aaa agc ccg gtg tat gtg ggc aac ggc gtg cat gcg aac ctg cat gtg	336
Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val	
100 105 110	
gcg ttt cat cgt agc agc agc gaa aaa atc cat agc aac gaa att agc	384
Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser	
115 120 125	
agc gat agc att gcg gtg ctg ggc tat cag aaa acc gtg gat cat acc	432
Ser Asp Ser Ile Ala Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr	
130 135 140	
aaa gtg aac tct aaa ctg agc ctg ttc ttc gaa atc aaa agc tga	477
Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser	
145 150 155	

<210> 13

<211> 158

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 13

ES 2 679 168 T3

```

Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Tyr Thr His Asp Gly
1          5          10          15

Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
          20          25          30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
          35          40          45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
          50          55          60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65          70          75          80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
          85          90          95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
          100          105          110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
          115          120          125

Ser Asp Ser Ile Ala Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr
          130          135          140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145          150          155

```

<210> 14

<211> 477

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polinucleótido sintético (secuencia codificante optimizada para DTR8)

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(474)

<400> 14

atg ggc aaa agc ccg ggt cat aaa acc gag ccg tat acc cat gat ggc	48
Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Tyr Thr His Asp Gly	
1 5 10 15	
tat acc gtg agc tgg aaa acc gtg gaa gat agc att att cgt acc ggc	96
Tyr Thr Val Ser Trp Lys Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly	
20 25 30	
ttt cag ggc gaa agc ggc cat gat att aaa att acc gcg gaa aac acc	144
Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr	
35 40 45	
ccg ctg ccg att gcg ggt gtt ctg ctg ccg acc att ccg ggc aaa ctg	192
Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu	
50 55 60	
gat gtg aac aaa agc aaa acc cat att agc acg aac ggc cgt aaa att	240
Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Thr Asn Gly Arg Lys Ile	
65 70 75 80	
cgt atg cgt tgc cgt gcg att gat ggt gat gtg acc ttt tgc cgt ccg	288
Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro	
85 90 95	
aaa agc ccg gtg tat gtg ggc aac ggc cag cat gcg aac ctg cat gtg	336
Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Gln His Ala Asn Leu His Val	
100 105 110	
gcg ttt gaa cgt aaa agc agc gaa aaa atc cat agc aac gaa att agc	384
Ala Phe Glu Arg Lys Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser	
115 120 125	
agc gat agc att gcg gtg ctg ggc tat cag aaa gaa gtg gat cat acc	432
Ser Asp Ser Ile Ala Val Leu Gly Tyr Gln Lys Glu Val Asp His Thr	
130 135 140	
aaa gtg aac tct aaa ctg agc ctg ttc ttc gaa atc aaa agc tga	477
Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser	
145 150 155	

<210> 15

<211> 158

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 15

ES 2 679 168 T3

Met	Gly	Lys	Ser	Pro	Gly	His	Lys	Thr	Glu	Pro	Tyr	Thr	His	Asp	Gly	1	5	10	15
Tyr	Thr	Val	Ser	Trp	Lys	Thr	Val	Glu	Asp	Ser	Ile	Ile	Arg	Thr	Gly	20	25	30	
Phe	Gln	Gly	Glu	Ser	Gly	His	Asp	Ile	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Asn	Thr	35	40	45	
Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Thr	Ile	Pro	Gly	Lys	Leu	50	55	60	
Asp	Val	Asn	Lys	Ser	Lys	Thr	His	Ile	Ser	Thr	Asn	Gly	Arg	Lys	Ile	65	70	75	80
Arg	Met	Arg	Cys	Arg	Ala	Ile	Asp	Gly	Asp	Val	Thr	Phe	Cys	Arg	Pro	85	90	95	
Lys	Ser	Pro	Val	Tyr	Val	Gly	Asn	Gly	Gln	His	Ala	Asn	Leu	His	Val	100	105	110	
Ala	Phe	Glu	Arg	Lys	Ser	Ser	Glu	Lys	Ile	His	Ser	Asn	Glu	Ile	Ser	115	120	125	
Ser	Asp	Ser	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Tyr	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	His	Thr	130	135	140	
Lys	Val	Asn	Ser	Lys	Leu	Ser	Leu	Phe	Phe	Glu	Ile	Lys	Ser			145	150	155	

<210> 16

<211> 477

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> polinucleótido sintético (secuencia codificante optimizada para DTRwt)

<220>

<221 > CDS

<222> (1)..(474)

15 <400> 16

atg ggc tac agc ccg ggt cat aaa acc cag ccg ttt ctg cat gat ggc	48
Met Gly Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly	
1 5 10 15	
tat gcg gtg agc tgg aac acc gtg gaa gat agc att att cgt acc ggc	96
Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly	
20 25 30	
ttt cag ggc gaa agc ggc cat gat att aaa att acc gcg gaa aac acc	144
Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr	
35 40 45	
ccg ctg ccg att gcg ggt gtt ctg ctg ccg acc att ccg ggc aaa ctg	192
Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu	
50 55 60	
gat gtg aac aaa agc aaa acc cat att agc gtg aac ggc cgt aaa att	240
Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile	
65 70 75 80	
cgt atg cgt tgc cgt gcg att gat ggt gat gtg acc ttt tgc cgt ccg	288
Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro	
85 90 95	
aaa agc ccg gtg tat gtg ggc aac ggc gtg cat gcg aac ctg cat gtg	336
Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val	
100 105 110	
gcg ttt cat cgt agc agc agc gaa aaa atc cat agc aac gaa att agc	384
Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser	
115 120 125	
agc gat agc att ggc gtg ctg ggc tat cag aaa acc gtg gat cat acc	432
Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr	
130 135 140	
aaa gtg aac tct aaa ctg agc ctg ttc ttc gaa atc aaa agc tga	477
Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser	
145 150 155	

<210> 17

<211> 158

5 <212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

10

<400> 17

ES 2 679 168 T3

Met Gly Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly
20 25 30

Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu Asn Thr
35 40 45

Pro Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
50 55 60

Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile
65 70 75 80

Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro
85 90 95

Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
100 105 110

Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser
115 120 125

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr
130 135 140

Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
145 150 155

<210> 18

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (péptido 1: DTR 378-392)

<400> 18

Met Gly Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp
1 5 10 15

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (péptido 2: DTR 385-399)

<400> 19

ES 2 679 168 T3

Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn
1 5 10 15

<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (péptido 3: DTR 391-405)

<400> 20

His Asp Gly Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile
1 5 10 15

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (péptido 4: DTR 397-411)

<400> 21

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

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (péptido 5: DTR 403-417)

<400> 22

Asp Ser Ile Ile Arg Thr Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp
1 5 10 15

<210> 23
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (péptido 6: DTR 409-423)

<400> 23

Gly Phe Gln Gly Glu Ser Gly His Asp Ile Lys Ile Thr Ala Glu
1 5 10 15

<210> 24
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>

ES 2 679 168 T3

<223> péptido sintético (péptido 7: DTR 415-429)

<400> 24

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

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (péptido 8: DTR 421-435)

15 <400> 25

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

<210> 26

20 <211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido sintético (péptido 9: DTR 427-441)

<400> 26

Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
1 5 10 15

30

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (péptido 10: DTR 433-447)

<400> 27

40

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

<210> 28

<211> 15

45 <212> PRT

<213> secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> péptido sintético (péptido 11: DTR 439-453)

50

<400> 28

Gly Lys Leu Asp Val Asn Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn
1 5 10 15

55 <210> 29

<211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> péptido sintético (péptido 12: DTR 445-459)
 <400> 29

Lys Ser Lys Thr His Ile Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met
 1 5 10 15

10

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15

<220>
 <223> péptido sintético (péptido 13: DTR 451-465)

20

<400> 30

Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp
 1 5 10 15

25

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30

<220>
 <223> péptido sintético (péptido 14: DTR 457-471)
 <400> 31

Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys
 1 5 10 15

35

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

40

<220>
 <223> péptido sintético (péptido 15: DTR 463-477)
 <400> 32

45

Ala Ile Asp Gly Asp Val Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val
 1 5 10 15

50

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

55

<220>
 <223> péptido sintético (péptido 16: DTR 469-483)
 <400> 33

ES 2 679 168 T3

	Thr Phe Cys Arg Pro Lys Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val
	1 5 10 15
5	<210> 34 <211> 15 <212> PRT <213> secuencia artificial
10	<220> <223> péptido sintético (péptido 17: DTR 475-489) <400> 34
	Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val
	1 5 10 15
15	<210> 35 <211> 15 <212> PRT <213> secuencia artificial
20	<220> <223> péptido sintético (péptido 18: DTR 482-496) <400> 35
	Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser
	1 5 10 15
25	<210> 36 <211> 15 <212> PRT <213> secuencia artificial
30	<220> <223> péptido sintético (péptido 19: DTR 488-502) <400> 36
	His Val Ala Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
	1 5 10 15
40	<210> 37 <211> 15 <212> PRT <213> secuencia artificial
45	<220> <223> péptido sintético (péptido 20: DTR 494-508) <400> 37
	Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser
	1 5 10 15
50	<210> 38 <211> 15 <212> PRT <213> secuencia artificial
55	<220> <223> péptido sintético (péptido 21: DTR 500-514)

<400> 38

His Ser Asn Glu Ile Ser Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr
1 5 10 15

5 <210> 39
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> péptido sintético (péptido 22: DTR 506-520)

<400> 39

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His
1 5 10 15

15 <210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido sintético (péptido 23: DTR 512-526)

25 <400> 40

Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys
1 5 10 15

30 <210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

35 <220>
<223> péptido sintético (péptido 24: DTR 518-532)

<400> 41

Val Asp His Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu
1 5 10 15

40 <210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

45 <220>
<223> péptido sintético (péptido 25: DTR 521-535)

<400> 42

50 Thr Lys Val Asn Ser Lys Leu Ser Leu Phe Phe Glu Ile Lys Ser
1 5 10 15

<210> 43
<211> 26

ES 2 679 168 T3

<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (DTRwt 378-403)

<400> 43

Met Gly Tyr Ser Pro Gly His Lys Thr Gln Pro Phe Leu His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp
20 25

<210> 44
<211> 26
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (DTR1 378-403)

<400> 44

Met Gly Lys Ser Pro Gly His Lys Thr Glu Pro Phe Thr His Asp Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp
20 25

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (DTRwt 389-397)

<400> 45

Phe Leu His Asp Gly Tyr Ala Val Ser
1 5

<210> 46
<211> 9
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (DTRwt 394-402)

<400> 46

Tyr Ala Val Ser Trp Asn Thr Val Glu
1 5

<210> 47

<211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

5

<220>
 <223> péptido sintético (DTR1 389-397)
 <400> 47

Phe Thr His Asp Gly Tyr Thr Val Ser
 1 5

10

<210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

15

<220>
 <223> péptido sintético (DTR1 394-402)
 <400> 48

20

Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu
 1 5

25

<210> 49
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

30

<220>
 <223> péptido sintético (DTR1 391-411)
 <400> 49

His Asp Gly Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile
 1 5 10 15

Arg Thr Gly Phe Gln
 20

35

<210> 50
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

40

<220>
 <223> péptido sintético (N399K variante 391-411)
 <400> 50

45

His Asp Gly Tyr Thr Val Ser Trp Lys Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile
 1 5 10 15

Arg Thr Gly Phe Gln
 20

ES 2 679 168 T3

<210> 51
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido sintético (V401Q variante 391-411)
 <400> 51
 10
 His Asp Gly Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Gln Glu Asp Ser Ile Ile
 1 5 10 15
 Arg Thr Gly Phe Gln
 20
 <210> 52
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido sintético (N399K/V401Q variante 391-411)
 20
 <400> 52
 His Asp Gly Tyr Thr Val Ser Trp Lys Thr Gln Glu Asp Ser Ile Ile
 1 5 10 15
 Arg Thr Gly Phe Gln
 20
 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> péptido sintético (DTR1 396-404)
 30
 <400> 53
 Val Ser Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser
 1 5
 35
 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> péptido sintético (DTR1 394-402)
 45
 <400> 54
 Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Val Glu
 1 5

<210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido sintético (DTR1 398-406)
 <400> 55
 10
 Trp Asn Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile
 1 5
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido sintético (N399K variante 398-406)
 20
 <400> 56
 Trp Lys Thr Val Glu Asp Ser Ile Ile
 1 5
 <210> 57
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> péptido sintético (N399K variante 396-404)
 30
 <400> 57
 Val Ser Trp Lys Thr Val Glu Asp Ser
 1 5
 35
 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> péptido sintético (V401Q variante 394-402)
 <400> 58
 45
 Tyr Thr Val Ser Trp Asn Thr Gln Glu
 1 5
 <210> 59
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> péptido sintético (DTR1 427-441)
 55

<400> 59

Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
1 5 10 15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (L427Q variante 427-441)

<400> 60

Gln Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (T436K variante 427-441)

<400> 61

Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Lys Ile Pro Gly Lys Leu
1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (L427Q/T436K variante 427-441)

<400> 62

Gln Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro Lys Ile Pro Gly Lys Leu
1 5 10 15

<210> 63

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (DTR1 432-440)

<400> 63

Val Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys
1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (T436K variante 432-440)

<400> 64

Val Leu Leu Pro Lys Ile Pro Gly Lys
1 5

<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (DTR1 433-441)

<400> 65

Leu Leu Pro Thr Ile Pro Gly Lys Leu
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (DTR1 427-435)

<400> 66

Leu Pro Ile Ala Gly Val Leu Leu Pro
1 5

<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (DTR1 451-465)

<400> 67

Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp
1 5 10 15

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (I457D variante 451-465)

<400> 68

Ser Val Asn Gly Arg Lys Asp Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp
1 5 10 15

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (I457E variante 451-465)
<400> 69

Ser Val Asn Gly Arg Lys Glu Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp
1 5 10 15

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (V452T variante 451-465)
<400> 70

Ser Thr Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp
1 5 10 15

<210> 71
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (R460T variante 451-465)

<400> 71

Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Thr Cys Arg Ala Ile Asp
1 5 10 15

<210> 72
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (A463D variante 451-465)

<400> 72

Ser Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg Cys Arg Asp Ile Asp
1 5 10 15

<210> 73
<211> 15
<212> PRT
<213> secuencia artificial

ES 2 679 168 T3

<220>

<223> péptido sintético (V452T/R460T/A463D variante 451-465)

<400> 73

5

Ser Thr Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Thr Cys Arg Asp Ile Asp
1 5 10 15

<210> 74

<211> 9

10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (DTR1 457-465)

15

<400> 74

Ile Arg Met Arg Cys Arg Ala Ile Asp
1 5

20

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> péptido sintético (R460T variante 457-465)

<400> 75

Ile Arg Met Thr Cys Arg Ala Ile Asp
1 5

30

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

35

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (A463D variante 457-465)

40

<400> 76

Ile Arg Met Arg Cys Arg Asp Ile Asp
1 5

45

<210> 77

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

50

<223> péptido sintético (V452T/R460T/A463D variante 451-465)

<400> 77

Ile Arg Met Thr Cys Arg Asp Ile Asp
1 5

55

<210> 78
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> péptido sintético (DTR1 452-460)
 <400> 78
 10
 Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Arg
 1 5
 <210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> péptido sintético (R460T variante 452-460)
 20
 <400> 79
 Val Asn Gly Arg Lys Ile Arg Met Thr
 1 5
 25
 <210> 80
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> péptido sintético (DTR1 475-502)
 <400> 80
 Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala
 1 5 10 15
 Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
 20 25
 35
 <210> 81
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> péptido sintético (Y478T variante 475-502)
 <400> 81
 45
 Ser Pro Val Thr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Ala
 1 5 10 15
 Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
 20 25
 <210> 82

ES 2 679 168 T3

<211> 28
<212> PRT
<213> secuencia artificial

5 <220>
<223> péptido sintético (V483D variante 475-502)

<400> 82

Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Asp His Ala Asn Leu His Val Ala
1 5 10 15

Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

10

<210> 83
<211> 28
<212> PRT
15 <213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (V483E variante 475-502)

20 <400> 83

Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Glu His Ala Asn Leu His Val Ala
1 5 10 15

Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

25

<210> 84
<211> 28
<212> PRT
<213> secuencia artificial

<220>
30 <223> péptido sintético (V483H variante 475-502)

<400> 84

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

Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

35

<210> 85
<211> 28
<212> PRT
40 <213> secuencia artificial

<220>
<223> péptido sintético (V483Q variante 475-502)

45 <400> 85

Ser Pro Val Tyr Val Gly Asn Gly Gln His Ala Asn Leu His Val Ala
1 5 10 15

Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

<210> 86

<211> 28

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (A490G variante 475-502)

<400> 86

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

Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

<210> 87

<211> 28

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (H492E variante 475-502)

<400> 87

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

Phe Glu Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

<210> 88

<211> 28

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (S494K variante 475-502)

<400> 88

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

Phe His Arg Lys Ser Ser Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

<210> 89

<211> 28

<212> PRT

<213> secuencia artificial

ES 2 679 168 T3

<220>

<223> péptido sintético (S496K variante 475-502)

<400> 89

5

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

Phe His Arg Ser Ser Lys Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

<210> 90

<211> 28

10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (Y478T/A490G/H492E/S494K/S496K variante 475-502)

15

<400> 90

Ser Pro Val Thr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn Leu His Val Gly
1 5 10 15

Phe Glu Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile His Ser Asn
20 25

20

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> péptido sintético (DTR1 478-486)

<400> 91

Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala Asn
1 5

30

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

35

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (DTR1 491-499)

40

<400> 92

Phe His Arg Ser Ser Ser Glu Lys Ile
1 5

45

<210> 93

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (DTR1 477-485)

<400> 93

5 Val Tyr Val Gly Asn Gly Val His Ala
1 5

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (DTR1 487-495)

15 <400> 94

Leu His Val Ala Phe His Arg Ser Ser
1 5

<210> 95

20 <211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> péptido sintético (V483D variante 478-486)

<400> 95

Tyr Val Gly Asn Gly Asp His Ala Asn
1 5

30

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

35

<220>

<223> péptido sintético (V483H variante 477-485)

<400> 96

40

Val Tyr Val Gly Asn Gly His His Ala
1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

45

<220>

<223> péptido sintético (V483Q variante 477-485)

50

<400> 97

Val Tyr Val Gly Asn Gly Gln His Ala
1 5

55

<210> 98

<211> 9

<212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 5 <223> péptido sintético (V483Q variante 478-486)

 <400> 98

 Tyr Val Gly Asn Gly Gln His Ala Asn
 1 5

 10 <210> 99
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 15 <220>
 <223> péptido sintético (A490G variante 487-495)

 <400> 99

 20 Leu His Val Gly Phe His Arg Ser Ser
 1 5

 <210> 100
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido sintético (H492E variante 491-499)
 30 <400> 100

 Phe Glu Arg Ser Ser Ser Glu Lys
 1 5

 35 <210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> secuencia artificial

 40 <220>
 <223> péptido sintético (H492E variante 487-495)

 <400> 101

 Leu His Val Ala Phe Glu Arg Ser Ser
 1 5

 45 <210> 102
 <211> 9
 <212> PRT
 50 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> péptido sintético (S494K variante 491-499)

 55 <400> 102

		Phe His Arg Lys Ser Ser Glu Lys Ile	
		1 5	
5	<210> 103 <211> 9 <212> PRT <213> secuencia artificial		
10	<220> <223> péptido sintético (S494K variante 487-495) <400> 103		
		Leu His Val Ala Phe His Arg Lys Ser	
		1 5	
15	<210> 104 <211> 9 <212> PRT <213> secuencia artificial		
20	<220> <223> péptido sintético (S494K variante 489-497) <400> 104		
		Val Ala Phe His Arg Lys Ser Ser Glu	
25		1 5	
30	<210> 105 <211> 9 <212> PRT <213> secuencia artificial		
35	<220> <223> péptido sintético (S496K variante 491-499) <400> 105		
		Phe His Arg Ser Ser Lys Glu Lys Ile	
		1 5	
40	<210> 106 <211> 15 <212> PRT <213> secuencia artificial		
45	<220> <223> péptido sintético (DTR1 506-520) <400> 106		
50		Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His	
		1 5 10 15	
55	<210> 107 <211> 15 <212> PRT <213> secuencia artificial		

ES 2 679 168 T3

<220>

<223> péptido sintético (T517D variante 506-520)

<400> 107

5

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Asp Val Asp His
1 5 10 15

<210> 108

<211> 15

10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético (T517E variante 506-520)

15

<400> 108

Ser Asp Ser Ile Gly Val Leu Gly Tyr Gln Lys Glu Val Asp His
1 5 10 15

20

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

25

<220>

<223> péptido sintético (DTR1 512-520)

<400> 109

Leu Gly Tyr Gln Lys Thr Val Asp His
1 5

30

REIVINDICACIONES

1. Proteína recombinante, que comprende un dominio R aislado de la toxina diftérica que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 % de identidad con los restos 380 a 535 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, comprendiendo dicha secuencia la combinación de sustituciones siguiente:
5 - Y380K y L390T,

y estando desprovista dicha secuencia, en su extremo N o C, de dicho dominio R, de la secuencia del dominio C y del dominio T de la toxina diftérica y de la secuencia de una proteína o de un dominio de proteína capaz de mejorar la estabilidad o la purificación de dicho dominio R, y siendo dicha proteína recombinante un ligando inhibidor del HB-EGF.
10
2. Proteína de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos las sustituciones Y380K, Q387E y L390T.
15
3. Proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende además la sustitución A395T.
4. Proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende también al menos una de las sustituciones F389Y y/o G510A.
20
5. Proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende también al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: N399K, V452T, T517E, V483Q, H492E, S494K, T436H y E497D.
6. Proteína de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende las sustituciones N399K, V452T, T517E, V483Q, H492E y S494K.
25
7. Proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende o consiste en una de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:2 a 5 y SEQ ID NO:7 a 9.
8. Proteína de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, marcada con un trazador detectable.
30
9. Polinucleótido aislado que codifica una proteína recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Vector recombinante de clonación y/o de expresión que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 9.
35
11. Célula modificada con un vector de acuerdo con la reivindicación 10.
12. Composición farmacéutica, que comprende al menos una proteína recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o un vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
40
13. Proteína recombinante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de enfermedades asociadas a una activación de la ruta HB-EGF/EGFR seleccionadas entre el grupo constituido por: glomerulonefritis de rápida progresión, cánceres, vasoespasmo asociado a contusiones cerebrales, hipertrofia cardíaca, hiperplasia de las células de la musculatura lisa, hipertensión pulmonar, retinopatías diabéticas y restenosis arterial.
45
14. Utilización de una proteína marcada de acuerdo con la reivindicación 8 para el diagnóstico *in vitro* de una enfermedad relacionada con una activación de la ruta del HB-EGF/EGFR seleccionada entre el grupo constituido por: glomerulonefritis de rápida progresión, cánceres, vasoespasmo asociado a contusiones cerebrales, hipertrofia cardíaca, hiperplasia de las células de la musculatura lisa, hipertensión pulmonar, retinopatías diabéticas y restenosis arterial.
50
55

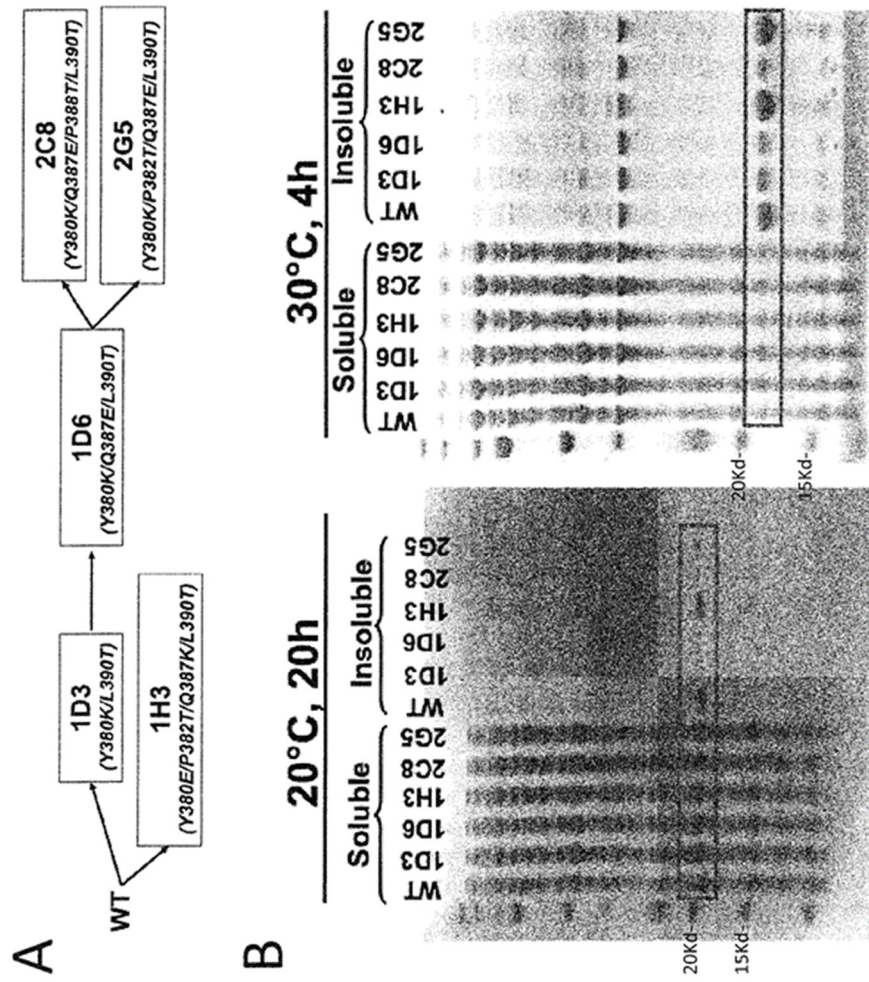


Figura 1

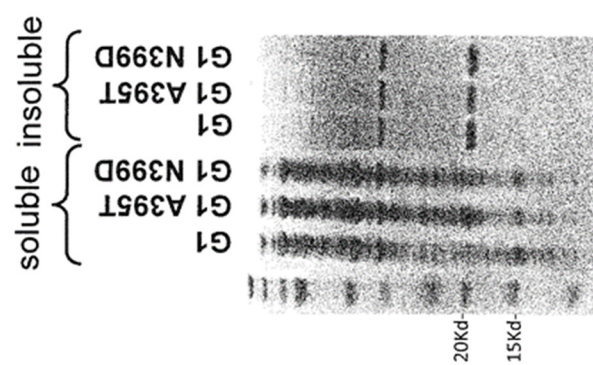


Figura 2

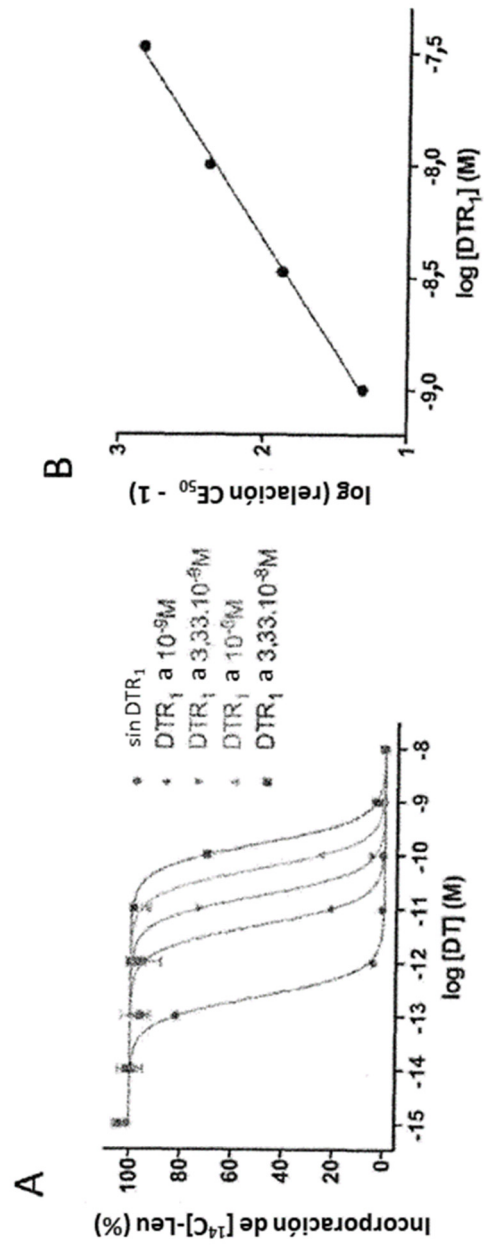


Figura 3

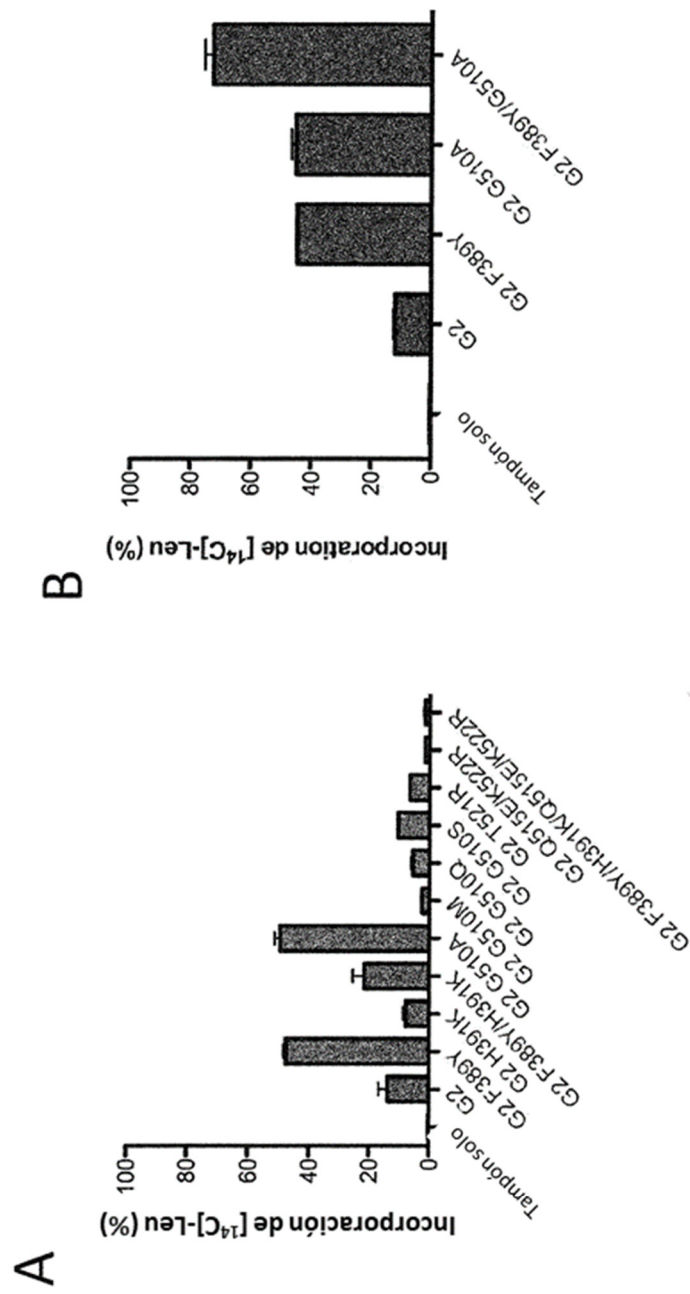


Figura 4

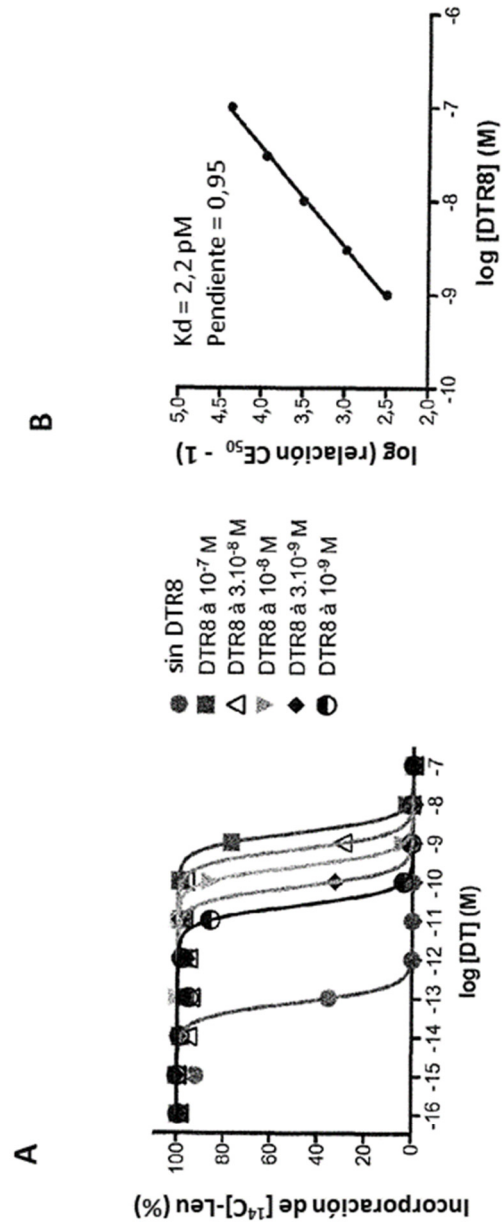


Figura 5

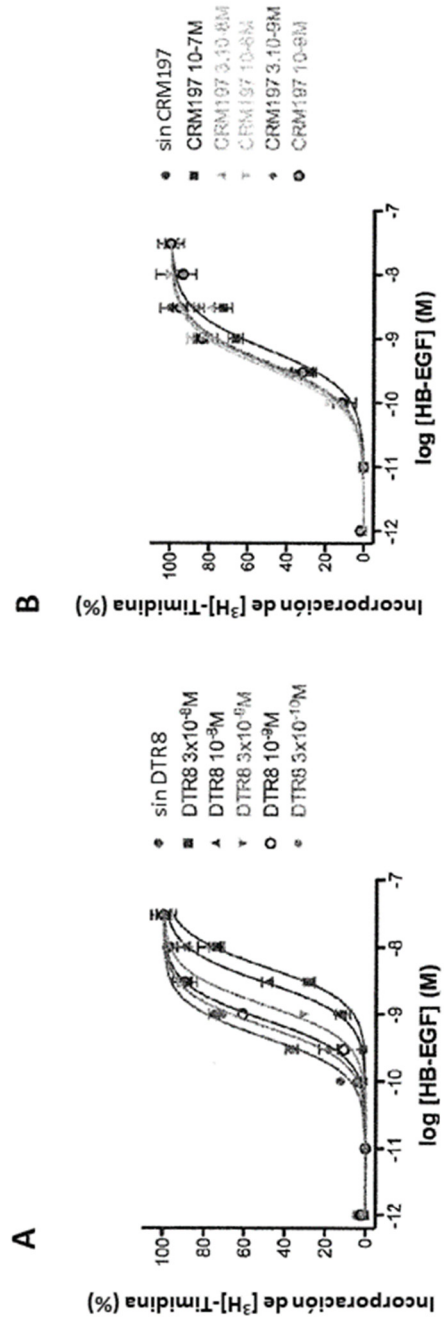


Figura 6

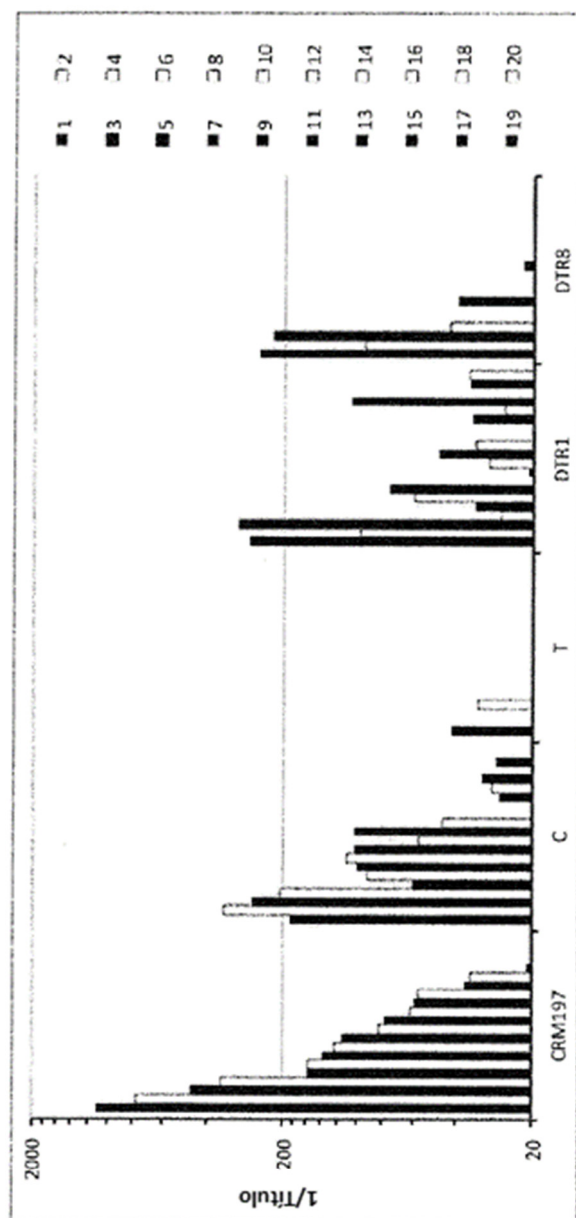


Figura 7