

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 862**

51 Int. Cl.:

C07K 14/25 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/31 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2015 PCT/US2015/012970**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.07.2015 WO15113007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2015 E 15704153 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 3099705**

54 Título: **Polipéptidos efectores desinmunizados de subunidad A de toxina Shiga para aplicaciones en mamíferos**

30 Prioridad:

27.01.2014 US 201461932000 P

11.09.2014 US 201462049325 P

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

24.03.2020

73 Titular/es:

**MOLECULAR TEMPLATES, INC. (100.0%)
111 W. Cooperative Way, Suite 201
Georgetown, TX 78626, US**

72 Inventor/es:

**POMA, ERIC;
WILLERT, ERIN;
ROBINSON, GARRETT LEE;
RAJAGOPALAN, SANGEETHA y
BRIESCHKE, BRIGITTE**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 749 862 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

Polipéptidos efectores desinmunizados de subunidad A de toxina Shiga para aplicaciones en mamíferos

5 CAMPO DE LA PRESENTE INVENCION

La presente invención se refiere a polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados derivados de subunidades A toxinas Shiga de origen natural, tal como se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos de la presente invención son beneficiosos solos o como componentes de moléculas, por ejemplo, agentes terapéuticos, para la administración a mamíferos, donde es deseable la reducción de las respuestas inmunes asociadas. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención se pueden usar como componentes de moléculas dirigidas específicamente, por ejemplo, inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina, para la eliminación selectiva de tipos de células específicas. Las proteínas de la presente invención tienen usos como, por ejemplo, componentes de agentes terapéuticos y de diagnóstico para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluyendo cánceres, tumores, trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas.

ANTECEDENTES

Las toxinas Shiga han sido diseñadas sintéticamente para aplicaciones médicas mediante alteraciones racionales a la estructura, las características y las actividades biológicas de la toxina (ver, por ejemplo US7713915, EP1051482, EP1727827, EP1945660; US2009/0156417 A1, EP2228383 B1, EP2402367 A1, US2013/0196928 A1, WO 2014/164680, WO 2014/164693). Las subunidades A de la toxina Shiga son estables, enzimáticamente activas y citotóxicas incluso si truncan o fusionan con otros dominios de la proteína (Haddad J et al, J Bacteriol. 175: 4970-8 (1993); Al-Jaufy A et al, Infect Immun 62.: 956-60 (1994); Al-Jaufy A et al, Infect Immun 63: 3073-8 (1995); LaPointe P et al, J Biol Chem 280.: 23310-18 (2005); Di R et al., Toxicon 57: 535-39 (2011)). Estos polipéptidos derivados de las subunidades A de la toxina Shiga pueden estar ligados o fusionados a dominios de inmunoglobulinas o ligandos receptores a través de conjugación química o ingeniería de proteínas recombinantes con el fin de crear moléculas terapéuticas dirigidas a células. Uno de los objetivos de dicha ingeniería molecular es diseñar moléculas químicas con la doble funcionalidad de: 1) liberar toxinas a tipos de células o lugares específicos dentro de un organismo después de la administración sistémica; y 2) efectuar una citotoxicidad dirigida a células específicas utilizando mecanismos citotóxicos potentes eficaces en células eucariotas.

Una de las principales limitaciones de aplicaciones terapéuticas que implican proteínas sintéticamente modificadas a partir de fuentes no humanas es la inmunogenicidad. La antigenicidad y/o inmunogenicidad resultan de la capacidad de un epítipo antigénico de una molécula para inducir un anticuerpo y/o respuesta inmunitaria cuando esa molécula se administra in vivo. La mayoría de las proteínas terapéuticas se cree que inducen una respuesta inmunitaria de algún tipo, que va desde la producción anticuerpos a bajo nivel, de baja afinidad y transitorios como IgM a anticuerpos IgG de alto nivel, de alta afinidad (Schellekens H, Clin Ther 24: 1720 -30 (2002); Schellekens H, Nat Rev Drug Discov 1: 457-62 (2002)). La inmunogenicidad no deseada de un producto terapéutico podría dar lugar a consecuencias desfavorables, tales como una eficacia reducida, una farmacocinética alterada, reacciones inmunitarias e hipersensibilidad generales, anafilaxis, y reacciones anafilactoides (Buttel I et al, Biologicals 39: 100-9 (2011)). Por ejemplo, la producción de anticuerpos neutralizantes o anticuerpos contra fármacos en un paciente puede limitar la eficacia a largo plazo de dosis repetidas o la administración crónica de un agente terapéutico.

Debido a que las respuestas inmunitarias no deseadas pueden plantear problemas de seguridad y/o eficacia significativos para un agente terapéutico, minimizar la antigenicidad y/o inmunogenicidad es a menudo deseable en el desarrollo de proteínas terapéuticas. Desafortunadamente, en la actualidad y, a pesar de la extensa investigación en laboratorio e investigación clínica, no es posible predecir antes de la administración a un paciente el grado en que una proteína terapéutica será inmunogénica (Descotes J, Gouraud A, Expert Opin Drug Metab Toxicol 4: 1537-49 (2008)). Esto es debido en gran parte a una falta de comprensión actual y la heterogeneidad de los mecanismos de generación de anticuerpos por los sistemas inmunitarios adaptativos de los vertebrados. Por ejemplo, los análisis de los complejos antígeno-anticuerpo no han revelado ninguna característica estructural determinante de un epítipo genérico, excepto tal vez para una mayor probabilidad de aminoácidos hidrófilos y voluminosos expuestos con altas áreas superficiales accesibles al disolvente.

A pesar de estas dificultades, se utilizan actualmente diversas estrategias para reducir el potencial inmunogénico de una proteína (véase, por ejemplo Onda M et al, Proc Natl Acad Sci USA. 105: 11311-6 (2008); Vallera D et al., Mol. Cancer Ther 9: 1872-1883 (2010)). El potencial inmunogénico de una proteína puede reducirse mediante la eliminación o alteración de epítopos susceptibles de ser reconocidos por el sistema inmunitario adaptativo. La alteración o eliminación de epítopos se puede lograr mediante mutación, por ejemplo, truncamiento, delección o sustitución de aminoácidos, o la humanización (Nagata S, Pastan I, Adv Drug Deliv Rev 61: 977-85 (2009); Baker, Met al, Self Nonself 1 : 314-22 (2010)).

Para la desinmunización de una molécula terapéutica, se da a menudo prioridad a la identificación y alteración de epítopos antigénicos de linfocitos B (células B) que probablemente producen anticuerpos de alta afinidad debido a la maduración de afinidad. Después de la activación del antígeno, las células B pueden diferenciarse en células de

plasma o células de memoria. Las células B activadas pueden someterse a cambio de clase para cambiar de expresar anticuerpos IgM e IgD de baja afinidad a la expresión de un único isotipo de Ig, IgG, IgE, IgA o IgD, que reconoce un epítipo antigénico discreto (Klein U et al., *Nat Rev Immunol* 8: 22-33 (2008)). Las células B activadas que expresan isotipos de Ig únicos pueden someterse a selección para aquellas células B que producen anticuerpos con alta afinidad a epítipos antigénicos específicos. Por lo tanto, la alteración de un epítipo en un agente terapéutico puede prevenir, tras la administración a un sujeto del agente terapéutico, la producción de anticuerpos de alta afinidad que se unen específicamente a ese epítipo, así como la formación de las células B de memoria de larga duración que reconocen ese epítipo.

Actualmente no hay técnicas estándar para la predicción precisa y completa de epítipos de células B en un polipéptido (Sathish J et al, *Nat Rev Drug Discov.* 12: 306-24 (2013)). Los epítipos de células B pueden identificarse mediante varios procedimientos empíricos usando una combinación de mutagénesis y anticuerpos, inmunización, o el cribado de expresión en fagos de bibliotecas de inmunoglobulina. Se pueden predecir posibles epítipos de células B usando herramientas computacionales que rastreen epítipos lineales y discontinuos predichos en una secuencia de polipéptido determinada que después pueden alterarse en un intento de silenciarlos (Larsen et al, *Immunome Res.* 2: 2 (2006); El-Manzalawy et al, *J Mol Recognit* 21: 243-55 (2008); Sollner J et al, *Immunome Res* 4: 1 (2008); Bryson C et al, *BioDrugs* 24: 1-8. (2010); Yao. B et al, *PLoS One* 8: e62249 (2013)). Estas predicciones computacionales de epítipos de células B no son muy precisas y por lo tanto deben ser verificadas experimentalmente (ver Nagata, *Adv Drug Deliv Rev* 61: 977-85 (2009)). La alteración de epítipos a menudo se intenta mediante la mutación de residuos cargados y/o aromáticos dentro de los posibles epítipos de células B a residuos de alanina (Onda M et al, *J Immunol* 177: 8822-34 (2006); Lui W et al, *Proc Natl Acad Sci. USA.* 109: 11782-7 (2012); Yumura K et al, *Protein Sci* 22: 213-21 (2012)). Además, un mapeo preciso y la alteración de todos los epítipos potenciales, a la vez que se mantiene la actividad bioterapéutica, pueden ser un objetivo difícil de alcanzar para proteínas más grandes (Brauer F et al, *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 678-88 (2013)).

Las toxinas Shiga son prometedoras para modificarse en productos útiles para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, pero su potencial inmunogenicidad puede ser un obstáculo para usos en aplicaciones médicas. Las toxinas Shiga son proteínas bacterianas que son altamente extrañas al sistema inmunológico humano. Sin embargo, los sitios antigénicos y/o inmunogénicos dentro de las subunidades A de toxinas Shiga no se han mapeado sistemáticamente. WO 96/30043 describe el tratamiento de *Escherichia coli* que produce verotoxina. La base de datos EMBL 10 septiembre de 2007, proporciona una "construcción sintética parcial A1-GMCSF proteína quimérica". Habibi Roudkenar M et al., *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 22 (3), 1 de mayo de 2006, páginas 213-219, describe la citotoxicidad selectiva de la proteína recombinante STXA1-GM-CSF en células cancerosas hematopoyéticas. WO 01/70945 describe proteínas recombinantes que contienen la toxina similar a Shiga y fragmentos del factor de crecimiento endotelial vascular. WO 2007/033497 describe una biblioteca de mutantes de toxinas y procedimientos de uso de los mismos. Onda Masanori et al: *PNAS*, vol. 105 (32), 12 agosto de 2008, páginas 11311-11316, describe una inmunotoxina con una inmunogenicidad ampliamente reducida mediante la identificación y eliminación de epítipos de células B. LaPointe P et al: *J. Biol. Chem.*, Vol. 280 (240), 17 de junio de 2005, páginas 23310-23318, describe un papel para la región del bucle sensible a proteasa de toxina similar a Shiga 1 en la retrotranslocación de su dominio A1 desde el lumen del retículo endoplásmico. Sería deseable tener polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga con la antigenicidad y/o inmunogenicidad reducidas, que retienen suficientes funciones efectoras de la toxina Shiga para aplicaciones médicas, por ejemplo, como componentes de diferentes agentes terapéuticos que implican la administración dirigida de la citotoxicidad a tipos de células específicos.

45 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona polipéptidos efectores de la toxina Shiga con un potencial antigénico y/o inmunogénico reducido en mamíferos (denominado en este documento como "desinmunizado"), tal como se define en las reivindicaciones. Además, la presente invención proporciona proteínas citotóxicas y proteínas de diagnóstico que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados, tal como se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos desinmunizados derivados de subunidades A de la toxina Shiga pueden estar unidos a uno o más polipéptidos que median el reconocimiento celular a través de interacciones de unión extracelulares específicas para permitir el diseño de agentes terapéuticos mejorados para el reconocimiento específico de tipos de células de la internalización celular y la citotoxicidad de la toxina Shiga. La unión de agentes promotores de la detección con polipéptidos de la región efectora de toxina Shiga desinmunizada permite el diseño de moléculas de diagnóstico mejoradas para detectar la presencia de tipos celulares específicos. Los polipéptidos y proteínas de la presente invención tienen usos para la destrucción de células seleccionadas, la administración de materiales exógenos en tipos celulares específicos, la obtención de información de diagnóstico, y como agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y condiciones, incluyendo cánceres, trastornos del sistema inmune e infecciones microbianas.

Un polipéptido de la presente invención comprende una región efectora de la toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga con al menos un epítipo de células B predicho eliminado o alterado por mutación de tal manera que se retiene al menos una función efectora de la toxina Shiga, tal como se define en las reivindicaciones.

Ciertas realizaciones de los polipéptidos descritos en el presente documento comprenden una región efectora de la toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga con al menos un epítipo de células B predicho eliminado o alterado por mutación en una forma tal que se retiene al menos una función efectora de la toxina Shiga; y en la que un epítipo de células T, ectópico, restringido a MHC de clase I no es introducido mediante alguna alteración de epítipo de células B. Los epítopos de células T restringidos a MHC de clase I son conocidos o pueden ser predichos por el experto. El término ectópico se refiere a epítopos de células T restringidos a MHC de clase I, que no están presentes de forma nativa en el polipéptido antes de que desinmunice dicho polipéptido, es decir, el polipéptido parental antes de eliminar y/o alterar uno o más epítopos de células B.

Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, la región efectora de la toxina Shiga que comprende una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 94 a 115 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de la SEQ ID NO: 3; 179-190 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de la SEQ ID NO: 3; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o 210-218 de la SEQ ID NO: 3; en la que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar una función efectora de la toxina Shiga.

Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, la región efectora de la toxina Shiga que comprende una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 94 a 115 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de la SEQ ID NO: 3; 179-190 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de la SEQ ID NO: 3; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o 210-218 de la SEQ ID NO: 3; en la que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar un nivel significativo de una función efectora de la toxina Shiga.

Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, comprendiendo la región efectora de la toxina Shiga una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 94 a 115 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de la SEQ ID NO: 3; 179-190 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de la SEQ ID NO: 3; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o 210-218 de la SEQ ID NO: 3; en la que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de una función efectora de la toxina Shiga; y en el que la alteración no es una región de epítipo única y no consiste únicamente en la sustitución de residuos de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: S96Y de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; Y114S de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179H de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; L185A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R188A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R205A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179A/R188A de la SEQ ID NO: 1; o SEQ ID NO: 2; o A188V de la SEQ ID NO: 3.

Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, comprendiendo la región efectora de la toxina Shiga una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 94 a 115 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de la SEQ ID NO: 3; 179-190 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de la SEQ ID NO: 3; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o 210-218 de la SEQ ID NO: 3; en la que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar un nivel significativo de la función efectora de la toxina Shiga; y en el que la alteración no es una región de epítipo única y no consiste únicamente en la sustitución de residuos de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: S96Y de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; Y114S de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179H de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; L185A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R188A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R205A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179A/R188A de la SEQ ID NO: 1; o SEQ ID NO: 2; o A188V de la SEQ ID NO: 3.

Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, comprendiendo la región efectora de la toxina Shiga una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de la SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; en la que la región

efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar una función efectora de la toxina Shiga; y en el que la región efectora de la toxina Shiga no comprende una superposición por truncamiento aminoterminal con una región epítipo alterada de la subunidad a de la toxina Shiga de la que derivaba que se superpone con una región epítipo alterada.

5 Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desimmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, comprendiendo la región efectora de la toxina Shiga una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de la SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; en la que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar un nivel significativo de una función efectora de la toxina Shiga; y en la que la región efectora de la toxina Shiga no comprende una superposición por truncamiento aminoterminal con una región epítipo alterada de la subunidad a de la toxina Shiga de la que derivaba que se superpone con una región epítipo alterada.

20 Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desimmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, comprendiendo la región efectora de la toxina Shiga una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de la SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; en la que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar una función efectora de la toxina Shiga; en la que la alteración no es de una única región de epítipo y no consiste sólo en la sustitución del residuo de aminoácido R63W de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y en la que la región efectora de la toxina Shiga no comprende una superposición por truncamiento aminoterminal con una región epítipo alterada de la subunidad a de la toxina Shiga de la que derivaba que se superpone con una región epítipo alterada.

30 Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desimmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, comprendiendo la región efectora de la toxina Shiga una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 240-260 de la SEQ ID NO: 3; 243-257 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de la SEQ ID NO: 3; 281-297 de la SEQ ID NO: 3; y 285 a 293 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; en la que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar una función efectora de la toxina Shiga; y en la que la región efectora de la toxina Shiga no comprende una superposición por truncamiento aminoterminal con una región epítipo alterada de la subunidad a de la toxina Shiga de la que derivaba que se superpone con una región epítipo alterada.

40 Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga desimmunizada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, comprendiendo la región efectora de la toxina Shiga una alteración de al menos una región del epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada entre el grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 240-260 de la SEQ ID NO: 3; 243-257 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de la SEQ ID NO: 3; 281-297 de la SEQ ID NO: 3; y 285-293 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; en la que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar una función efectora de la toxina Shiga; en la que la alteración no es de una única región de epítipo y no consiste solamente en la sustitución de residuos de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: R248H de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; A250V de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R251H de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; A253G de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; S254T de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; C261A de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R289K de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R248H y R251H de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; S254T A253G y de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; la supresión de S247-M252 de la SEQ ID NO: 1; S246F de la SEQ ID NO: 3; A282V de la SEQ ID NO: 3; 1291V de la SEQ ID NO: 3; S246F/1291V de la SEQ ID NO: 3; y en la que la región efectora de la toxina Shiga no comprende una superposición por truncamiento aminoterminal con una región epítipo alterada de la subunidad a de la toxina Shiga de la que derivaba que se superpone con una región epítipo alterada.

60 En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga desimmunizado de la descripción comprende una alteración del epítipo que comprende una delección de al menos un aminoácido dentro de una región de epítipo proporcionada en este documento. En ciertas realizaciones adicionales, un polipéptido de la descripción comprende una alteración del epítipo que comprende una inserción de al menos un aminoácido dentro de una región de epítipo proporcionada. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una inversión u otra reordenación de aminoácidos, en los que al menos un aminoácido invertido está dentro de la región de epítipo proporcionada. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden una alteración de epítipo que comprende una mutación de residuos de aminoácidos, tal como una única

sustitución de aminoácido a un aminoácido no estándar o un aminoácido con una cadena lateral modificada químicamente.

- 5 En ciertas realizaciones, las regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas comprenden una alteración de epítipo que comprende una sustitución de residuo de aminoácido dentro de una región de epítipo proporcionada en este documento. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden al menos una sustitución de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H y K. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido comprende una sustitución seleccionada entre el grupo que consiste en: D a A, D a G, D a V, D a L, D a I, D a F, D a S, D a Q, E a A, E a G, E a V, E a L, E a I, E a F, E a S, E a Q, E a N, E a D, E a M, E a R, G a A, H a A, H a G, H a V, H a L, H a I, H a F, H a M, K a A, K a G, K a V, K a L, K a I, K a M, K a H, L a A, L a G, N a A, N a G, N a V, N a L, N a I, N a F, P a A, P a G, P a F, R a A, R a G, R a V, R a L, R a I, R a F, R a M, R a Q, R a S, R a K, R a H, S a A, S a G, S a V, S a L, S a I, S a F, S a M, T a A, T a G, T a V, T a L, T a I, T a F, T a M, T a S, Y a A, Y a G, Y a V, Y a L, Y a I, Y a F e Y a M.
- 10
- 15 En ciertas realizaciones, las regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas comprenden una alteración que comprende una sustitución de residuo de aminoácido dentro de una región del epítipo, en el que la sustitución se produce en el aminoácido posicionado de forma nativa seleccionado del grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 1 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 8 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 9 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 11 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 33 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 49 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 59 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 60 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 96 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 109 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 110 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; SE 147 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 179 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 180 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 185 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 3; 248 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de la SEQ ID NO: 3; 251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 265 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden una alteración de epítipo que comprende una sustitución de residuo de aminoácido dentro de una región del epítipo, en el que la sustitución es cualquier aminoácido no conservativo y la sustitución se produce en el residuo de aminoácido seleccionado del grupo de residuos de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 1 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 8 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 9 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 11 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 33 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 49 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 59 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 60 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 96 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 109 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 110 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; SE 147 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 179 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 180 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 185 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 3; 248 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de la SEQ ID NO: 3; 251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 265 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Una sustitución de aminoácido no conservativa es una sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una o más propiedades bioquímicas marcadamente diferentes, tales como, por ejemplo, con carga a sin carga, polar a hidrófobo, y voluminoso a pequeño. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden una alteración de epítipo que comprende una sustitución de residuo de aminoácido dentro de una región del epítipo, en el que la sustitución se produce en el residuo de aminoácido posicionado de forma nativa y la sustitución es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; S8 a A, G, V, I, L, F, y M; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F, y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; S33 a A, G, V, L, I, F, y M; S45 a A, G, V, L, I, F, y M; T45 a A, G, V, L, I, F, y M; D47 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; N48 a A, G, V, L, y M; L49 a A o G; D53 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; D58 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; P59 a A, G, y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; D94 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; S96 a A, G, V, I, L, F, y
- 55
- 60
- 65

M; S109 a A, G, V, I, L, F, y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F, y M; G147 a A; R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; S186 a A, G, V, I, L, F y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; S189 a A, G, V, I, L, F, y M; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F, y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

5
10
15
Para ciertas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención comprenden la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada derivada de los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos de la presente invención comprenden una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada derivada de los aminoácidos 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1 y/o los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención comprenden la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada derivada de los aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, tal como se define en las reivindicaciones.

Para ciertas realizaciones, los polipéptidos de la presente invención comprenden la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende o que consiste esencialmente en cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-52.

20
25
Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan una proteína que comprende una región de unión para reconocimiento celular unida a una región derivada de la subunidad A de la toxina Shiga desinmunizada que presenta una o más funciones efectoras de la toxina Shiga, por ejemplo, la actividad citotóxica, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas de la presente invención comprenden una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende un polipéptido de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, y una región de unión que comprende uno o más polipéptidos que son capaces de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular.

30
35
40
En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: polipéptido FR3-CDR3-FR4 (FR3-CDR3-FR4) restringido a fragmento de una región determinante de complementariedad 3 (CDR3), fragmento de anticuerpo de un solo dominio (sdAb), nanoanticuerpo, dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un camélido (fragmento V_HH), dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un pez cartilaginoso, nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento V_{NAR}, fragmento variable de cadena única (scFv), fragmento de anticuerpo variable (Fv), fragmento de unión a antígeno (Fab), fragmento Fd, dominio inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), 10^o dominio de tipo III de fibronectina derivado de fibronectina (10Fn3) (por ejemplo, monocuerpo), dominio de tipo III de tenascina, dominio del motivo de repetición de anquirina (ARD), dominio A derivado de lipoproteína de baja densidad (dominio A de LDLR o LDLR-A), lipocalina (anticalina), dominio Kunitz, dominio Z derivado de Proteína A, dominio derivado de gamma B cristalina (afilina), dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d, dominio SH2 derivado de Fyn (afitina), miniproteína, andamios estructurales de dominio del tipo lectina de tipo C, mimético de anticuerpo manipulado y cualquier homólogo genéticamente manipulado de cualquiera de los anteriores que retenga la funcionalidad de unión.

45
En ciertas realizaciones de la presente invención, tras la administración de la proteína citotóxica desinmunizada de la presente invención a una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína citotóxica, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte de la célula.

50
En ciertas realizaciones de la presente invención, tras la administración de la proteína citotóxica desinmunizada de la presente invención a dos poblaciones diferentes de tipos de células con respecto a la presencia de una biomolécula diana extracelular, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte celular a los tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína citotóxica en una CD₅₀ al menos tres veces o menos que la CD₅₀ a tipos de células que no se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular de la proteína citotóxica de la región de unión.

55
60
65
En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la región de unión está diseñada o seleccionada por su capacidad para unirse a la biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD74, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, CDMP1, endoglina, proteína activada por fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, EpCAM, CEA, gpA33, mucina, TAG-72, anhidrasa carbónica IX, proteína de unión a folato, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido Lewis-Y2, VEGFR, Alfa Vbeta3, Alfa5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, beta-catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART-1/MelanuA, gp100, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus de Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfa-fetoproteína, 17-A1, antígeno de tumor de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεRIα, galectina-9, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d,

CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, CD193, TLR4, FcεR1a, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, cD11a-c, GITRL, MHC Clase II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2, CD11c, y cualquier fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores.

5 En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden un motivo de señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático carboxi-terminal de un miembro de la familia KDEL. En ciertas realizaciones adicionales, las proteínas de la presente invención comprenden un motivo de señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático carboxi-terminal seleccionado del grupo que consiste en: KDEL (SEQ ID NO: 60), HDEF (SEQ ID NO: 61), HDEL (SEQ ID NO: 62), RDEF (SEQ ID NO: 63), RDEL (SEQ ID NO: 64),
 10 WDEL (SEQ ID NO: 65), YDEL (SEQ ID NO: 66), HEEF (SEQ ID NO: 67), HEEL (SEQ ID NO: 68), KEEL (SEQ ID NO: 69), REEL (SEQ ID NO: 70), KAEL (SEQ ID NO: 71), KCEL (SEQ ID NO: 72), KFEL (SEQ ID NO: 73), KGEL (SEQ ID NO: 74), KHEL (SEQ ID NO: 75), KLEL (SEQ ID NO: 76), KNEL (SEQ ID NO: 77), KQEL (SEQ ID NO: 78), KREL (SEQ ID NO: 79), KSEL (SEQ ID NO: 80), KVEL (SEQ ID NO: 81), KWEL (SEQ ID NO: 82), KYEL (SEQ ID NO: 83), KEDL (SEQ ID NO: 84), KIEL (SEQ ID NO: 85), DKEL (SEQ ID NO: 86), FDEL (SEQ ID NO: 87), KDEF (SEQ ID NO: 88), KKEL (SEQ ID NO: 89), HADL (SEQ ID NO: 90), HAEL (SEQ ID NO: 91), HIEL (SEQ ID NO: 92), HNEL (SEQ ID NO: 93), HTEL (SEQ ID NO: 94), KTEL (SEQ ID NO: 95), HVEL (SEQ ID NO: 96), NDEL (SEQ ID NO: 97), QDEL (SEQ ID NO: 98), REDL (SEQ ID NO: 99), RNEL (SEQ ID NO: 100), RTDL (SEQ ID NO: 101), RTEL (SEQ ID NO: 102), SDEL (SEQ ID NO: 103), TDEL (SEQ ID NO: 104) y SKEL (SEQ ID NO: 105).

20 Para ciertas realizaciones, la proteína de la presente invención comprende una región de unión y una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada, tal como se define en las reivindicaciones, que están orientadas físicamente dentro de la proteína de modo que dicha región de unión no se encuentra adyacente al extremo aminoterminal de la región efectora de la toxina Shiga.

25 Para ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden una región efectora de la toxina Shiga derivada de los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, tal como se define en las reivindicaciones. Ciertas realizaciones adicionales proporcionan proteínas en las que la región efectora de la toxina Shiga deriva de los aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1 y/o los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden una región efectora de la toxina Shiga derivan de los aminoácidos 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1, tal como se define en las reivindicaciones.

Para ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende o que consiste esencialmente en cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-52.

35 Para ciertas realizaciones, la proteína de la presente invención comprende o consiste esencialmente en SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, o SEQ ID NO: 59.

40 En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende además una mutación con relación a una subunidad A natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia la actividad enzimática de la región efectora de la toxina Shiga, la mutación seleccionada de la eliminación o sustitución de al menos un residuo de aminoácidos, tal como, por ejemplo, A231E, R75A, Y77S, Y114S, E167D, R170A, R176K y/o W203A en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones adicionales, las proteínas de la presente invención comprenden una mutación que reduce o elimina la actividad catalítica pero conserva al menos otra función o funciones efectoras de la toxina Shiga.

50 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido y/o proteína de la presente invención y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, tal como se define en las reivindicaciones; y el uso de dicha proteína o una composición que la comprende en procedimientos de la presente invención como se describe adicionalmente en el presente documento y se define en las reivindicaciones.

Más allá de los polipéptidos, proteínas y composiciones de la presente invención, los polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada o proteína de la presente invención que comprende un región efectora de la toxina Shiga desinmunizada de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención, así como vectores de expresión que comprenden un polinucleótido de la presente invención y las células huésped que comprenden un vector de expresión de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. Las células huésped que comprenden un vector de expresión se pueden usar, por ejemplo, en los procedimientos para producir un polipéptido y/o proteína de la presente invención, o un componente de polipéptido o fragmento del mismo, mediante la expresión recombinante.

60 Adicionalmente, la presente invención proporciona procedimientos in vitro de eliminar selectivamente la célula o células que comprende la etapa de poner en contacto una célula o células con una proteína de la presente invención o una composición farmacéutica que comprende dicha proteína de la presente invención.

65 La presente invención proporciona además para el tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones en pacientes en necesidad del mismo usando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición que comprende

5 un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada de la presente invención, un polipéptido y/o que lo comprende, o una composición que comprende cualquiera de los anteriores (por ejemplo, una composición farmacéutica), tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección a tratar utilizando este procedimiento de la presente invención se selecciona de: un cáncer, tumor, trastorno inmunitario o infección microbiana. En ciertas realizaciones, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza-cuello, cáncer hematológico, cáncer de riñón-tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer de útero. En ciertas realizaciones de este procedimiento, el trastorno inmunitario a tratar es un trastorno inmunitario asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, y vasculitis.

10 Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una composición que comprende una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada de la presente invención, un polipéptido y/o proteína que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado de la presente invención, o una composición que comprende cualquiera de los anteriores, para usar en el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, trastorno inmune o infección microbiana, tal como se define en las reivindicaciones.

15 Ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención se pueden usar para administrar uno o más materiales adicionales exógenos en una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la proteína de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención proporciona un procedimiento in vitro para la administración de material exógeno al interior de una célula o células, que comprende poner en contacto la célula o células con una proteína de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones.

20 Entre ciertas realizaciones de la presente invención está el uso de un polipéptido o proteína de la presente invención y/o composición de diagnóstico de la presente invención en el diagnóstico, pronóstico o caracterización in vitro de una enfermedad, trastorno o afección, tal como se define en las reivindicaciones.

25 Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una composición de diagnóstico que comprende una proteína que comprende un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, y un agente promotor de la detección para la recogida de información, tal como información útil para el diagnóstico de un tipo de célula, tejido, órgano, enfermedad, trastorno, afección o paciente.

30 Entre ciertas realizaciones de la presente descripción está el procedimiento de detectar una célula usando una proteína y/o la composición de diagnóstico de la presente invención que comprende las etapas de poner en contacto una célula con dicha proteína y/o composición de diagnóstico y detectar la presencia de dicha proteína y/o composición de diagnóstico. En ciertas realizaciones, la etapa de poner en contacto la célula o células se produce in vitro. En ciertas realizaciones, la etapa de poner en contacto la célula o células se produce in vivo. En ciertas realizaciones, la etapa de detección de la célula o células se produce in vitro. En ciertas realizaciones, la etapa de detección de la célula o células se produce in vivo.

35 Una composición de diagnóstico de la presente invención puede usarse para detectar una célula in vivo mediante la administración a un sujeto mamífero de una composición que comprende proteína de la presente invención, que comprende un agente promotor de la detección y a continuación detectar la presencia de la proteína de la presente invención ya sea in vitro o in vivo. La información recogida puede considerar la presencia de una célula acoplada físicamente con una diana extracelular de la región de unión de la proteína de la presente invención y puede ser útil en el diagnóstico, el pronóstico, la caracterización y/o el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección. Ciertos compuestos (por ejemplo, polipéptidos y proteínas) de la presente invención, composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas y composiciones de diagnóstico) de la presente invención, y procedimientos de la presente invención se pueden usar para determinar si un paciente pertenece a un grupo que responde a una composición farmacéutica de la presente invención.

40 Los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar como un inmunógeno o como un componente de un inmunógeno para la inmunización y/o vacunación de un mamífero.

45 Entre ciertas realizaciones de la presente invención están kits que comprenden una composición de materia de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, y un reactivo o reactivos adicionales, y/o un dispositivo o dispositivos de administración farmacéutica.

50 Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y figuras adjuntas. Los elementos mencionados anteriormente de la presente invención se pueden combinar individualmente o eliminar libremente con el fin de formar otras realizaciones

de la presente invención dentro del alcance de las reivindicaciones, sin ninguna declaración de oposición a dicha combinación o eliminación en lo sucesivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 5 La **figura 1** muestra la disposición general de los polipéptidos desinmunizados y proteínas citotóxicas.
- La **figura 2** muestra que la sustitución D58A en una región efectora de toxina Shiga desinmunizada alteró de forma efectiva el epítipo reconocido por pAb2 en condiciones desnaturalizantes y redujo la antigenicidad del polipéptido que comprende una región efectora de la toxina Shiga.
- 10 La **figura 3** muestra que la sustitución D58A en el contexto de múltiples variantes de alteración de la región de epítipo de regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizada alteró de forma efectiva el epítipo reconocido por pAb2 en condiciones desnaturalizantes y redujo la antigenicidad del polipéptido que comprende una región efectora de la toxina Shiga.
- La **figura 4** muestra que las múltiples variantes de alteración de la región de epítipo de regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas alteraron los epítipos reconocidos por pAb2 y mAb1 en condiciones desnaturalizantes. Estas múltiples variantes de alteración de la región de epítipo tienen una antigenicidad reducida en comparación con un polipéptido que comprende la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje parental.
- 15 La **figura 5** muestra que las múltiples variantes de alteración de la región de epítipo regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas alteraron eficazmente los epítipos reconocidos por pAb2 y/o mAb1 en condiciones desnaturalizantes. Estas múltiples variantes de alteración de la región de epítipo tienen una antigenicidad reducida en comparación con un polipéptido que comprende la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje parental.
- La **figura 6** muestra que una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende múltiples alteraciones de la región de epítipo dio lugar a una alteración muy eficaz del epítipo reconocido por mAb1 en condiciones de plegamiento de proteínas nativas. Estas múltiples variantes de alteración de la región de epítipo tenían una antigenicidad reducida en comparación con un polipéptido que comprende la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje parental.
- 20 La **figura 7** muestra que una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada que comprende múltiples alteraciones de la región de epítipo dio lugar a una respuesta o respuestas reducidas de anticuerpos in vivo por un sistema inmunitario de los mamíferos. Estas múltiples variantes de alteración de la región de epítipo tenían una antigenicidad reducida en comparación con un polipéptido que comprende la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje parental.
- 25
- 30

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 35 La presente invención se describe más completamente en lo sucesivo usando realizaciones ilustrativas, no limitantes, y las referencias a las figuras adjuntas. La presente invención puede, sin embargo, realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas a continuación. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción sea exhaustiva y transmita el alcance de la invención a los expertos en la técnica.
- 40 A fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definen a continuación. Se pueden encontrar definiciones adicionales dentro de la descripción detallada de la presente invención.
- Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, los términos "un", "una" y "el/la" incluyen tanto los referentes singular y plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.
- 45 Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" cuando se refiere a dos especies, A y B, significa al menos uno de A y B. Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" cuando hace referencia a más de dos especies, tales como A, B, y C, significa al menos uno de A, B, o C, o al menos uno de cualquier combinación de A, B, o C (con cada especie en posibilidad singular o múltiple).
- 50 A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se entenderán que implican la inclusión de un número entero (o componentes) o grupo de números enteros (o componentes) indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero (o componentes) o grupo de números enteros (o componentes).
- 55 En toda esta memoria descriptiva, el término "que incluye" se usa para significar "que incluye, pero no limitado a". "Que incluye" y "que incluye, pero no limitado a" se utilizan indistintamente.
- 60 El término "residuo de aminoácido" o "aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido. El término "polipéptido" incluye cualquier polímero de aminoácidos o residuos de aminoácidos. El término "secuencia de polipéptido" se refiere a una serie de aminoácidos o residuos de aminoácidos que comprenden físicamente un polipéptido. Una "proteína" es una macromolécula que comprende uno o más polipéptidos o "cadenas" de polipéptido. Un "péptido" es un pequeño polipéptido de tamaño de menos de un total de 15-20 residuos de aminoácidos. El término "secuencia de aminoácidos" se refiere a una serie de aminoácidos o
- 65

residuos de aminoácidos que comprenden físicamente un péptido o polipéptido dependiendo de la longitud. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de polipéptidos y proteínas descritas en este documento se escriben de izquierda a derecha representando su orden de un extremo amino terminal a un extremo carboxi terminal.

- 5 Los términos "aminoácido", "residuo de aminoácido", "secuencia de aminoácidos", o "secuencias de polipéptidos" incluyen aminoácidos de origen natural y, a menos que se limite de otro modo, también incluyen análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los aminoácidos de origen natural, tales como selenocisteína, pirrolisina, N-formilmetionina, gamma-carboxiglutamato, hidroxiprolinahipusina, ácido piroglutámico y selenometionina. Los aminoácidos referidos en este documento por designaciones taquigráficas se indican en la Tabla A:

Tabla A: Nomenclatura de aminoácidos

Nombre	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico o aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico o glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

- 15 La frase "sustitución conservativa" con respecto a un polipéptido, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos del polipéptido que no altera sustancialmente la función y la estructura del polipéptido general (véase Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (WH Freeman and Company, Nueva York (2ª ed., 1992)).

- 20 Tal como se usa en el presente documento, los términos "expresado", "que expresa", o "expresa", y las variantes gramaticales de los mismos, se refieren a la traducción de un polinucleótido o ácido nucleico en un polipéptido o proteína. Los polipéptidos o proteínas expresadas pueden permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o secretarse en un espacio extracelular.

- 25 Tal como se usa en el presente documento, el símbolo "α" es la abreviatura de una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a la biomolécula después del símbolo. El símbolo "α" se utiliza para referirse a la característica funcional de una región de unión de tipo inmunoglobulina en base a su capacidad de unirse a la biomolécula después del símbolo.

- 30 El símbolo "::" significa las regiones de polipéptidos antes y después de que se unan físicamente entre sí para formar un polipéptido continuo.

- 35 Tal como se usa en la memoria descriptiva, el símbolo "/" cuando está situado entre dos sustituciones de residuos de aminoácidos significa las sustituciones de residuos de aminoácidos en cada lado de "/" o comprendidos dentro de la misma molécula.

- 40 Para los propósitos de la presente invención, la frase "derivado de" significa que la región de polipéptido comprende secuencias de aminoácidos halladas originalmente en una proteína y que ahora pueden comprender adiciones, deleciones, truncamientos u otras alteraciones de la secuencia original, de manera que la función global y estructura se conservan sustancialmente.

Para los propósitos de la presente invención, el término "efector" significa proporcionar una actividad biológica, tal como citotoxicidad, señalización biológica, catálisis enzimática, direccionamiento subcelular y/o unión intermolecular, que da lugar al reclutamiento de un factor o factores y/o efecto o efectos alostéricos.

Para los propósitos de la presente invención, una función efectora de la toxina Shiga es una actividad biológica conferida por una región de polipéptido derivada de una subunidad A de la toxina Shiga. Los ejemplos no limitativos de funciones efectoras de la toxina Shiga incluyen la internalización celular, direccionamiento subcelular, actividad catalítica y la citotoxicidad. Ejemplos no limitantes de las actividades catalíticas de la toxina Shiga incluyen la inactivación de ribosomas, inhibición de la síntesis de proteínas, la actividad de N-glicosidasa, actividad de polinucleótido:adenosina glicosidasa, la actividad de la ARNasa y la actividad ADNasa. Las RIPs pueden despurinar ácidos nucleicos, polinucleósidos, polinucleótidos, ARNr, ADNss, ADNds, ARNm (y poliA), y ácidos nucleicos virales (Barbieri L et al, *Biochem J* 286: 1-4 (1992); Barbieri L et al, *Nature* 372: 624 (1994); Ling J et al, *FEBS Lett* 345: 143-6 (1994); Barbieri L et al, *Biochem J* 319: 507-13 (1996); Roncuzzi L, Gasperi-Campani A, *FEBS Lett* 392: 16-20 (1996); Stirpe F et al, *FEBS Lett* 382: 309-12 (1996); Barbieri L et al, *Nucleic Acids Res.* 25: 518-22 (1997); Wang P, Turner N, *Nucleic Acids Res* 27: 1900-5 (1999); Barbieri L et al, *Biochim Biophys Acta* 1480: 258-66 (2000); Barbieri L et al, *J Biochem* 128: 883-9 (2000); Brigotti. M et al, *Toxicon* 39: 341-8 (2001); Brigotti M et al, *FASEB J* 16: 365-72 (2002); Bagga S et al, *J Biol Chem* 278: 4813-20 (2003); Picard D et al, *J Biol Chem* 280: 20069-75 (2005)). Algunas RIPs muestran actividad antiviral y actividad superóxido dismutasa (Erica A et al, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 835-8 (1993); Au T et al, *FEBS Lett* 471: 169-72 (2000); Parikh B, Tumer N, *Mini Rev Med Chem.* 4: 523-43 (2004); Sharma N et al, *Plant Physiol* 134: 171-81 (2004)). Las actividades catalíticas de toxinas Shiga se han observado tanto *in vitro* como *in vivo*. Los ensayos para la actividad efectora de la toxina Shiga pueden medir diferentes actividades, tales como, por ejemplo, actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, la actividad de despurinación, la inhibición del crecimiento celular, la citotoxicidad, la actividad de relajación de ADN superenrollado y/o actividad de nucleasa.

El término "citotoxicidad selectiva" con respecto a la actividad citotóxica de una proteína citotóxica se refiere a los niveles relativos de citotoxicidad entre una población de células diana y una población de células no diana observadoras, que puede ser expresada como una relación de la concentración citotóxica semimáxima (CD_{50}) para un tipo de célula diana sobre la CD_{50} para un tipo de célula no diana para mostrar preferencialidad de eliminación celular del tipo de célula diana.

Tal como se usa en el presente documento, la retención de la función efectora de la toxina Shiga se refiere a un nivel de actividad funcional de la toxina Shiga, tal como se mide por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad comparable a un control de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje. Para la inhibición de ribosomas, la función efectora de la toxina Shiga función efectora es mostrar una CI_{50} de 10.000 picomolar (pM) o menos. Para la citotoxicidad en un ensayo de eliminación de células positivas de diana, la función efectora de la toxina Shiga es mostrar una CD_{50} de 1.000 nanomolar (nM) o menos, dependiendo del tipo de célula y su expresión de la biomolécula diana extracelular apropiada.

Tal como se usa en el presente documento, "desinmunizado" significa un potencial antigénico y/o inmunogénico reducido tras la administración a un mamífero. Esto incluye un potencial general antigénico y/o inmunogénico reducido a pesar de la introducción de uno o más nuevos epítomos.

Introducción

La presente invención proporciona polipéptidos mejorados derivados de subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga con potencial inmunogénico reducido, tal como se define en las reivindicaciones. Estos polipéptidos efectores de la toxina Shiga mejorados se pueden utilizar en diversas composiciones, por ejemplo agentes terapéuticos citotóxicos, agentes de administración terapéuticos, moléculas de diagnóstico y materiales de inmunización.

A pesar del atractivo de utilizar toxinas Shiga como componentes de agentes terapéuticos, las toxinas bacterianas tienden a ser inmunogénicas para los mamíferos. La inmunogenicidad no deseada en agentes terapéuticos de proteínas ha dado lugar a una eficacia reducida, una farmacocinética impredecible y respuestas inmunes indeseables que limitan la dosis y administraciones repetidas. Aunque hay una necesidad de moléculas que comprendan polipéptidos derivados de toxina Shiga desinmunizados que tienen un potencial inmunogénico reducido para ayudar a evitar las respuestas inmunitarias no deseadas, no existe un procedimiento predecible para identificar con éxito y eliminar epítomos de células B internas, mientras se mantiene la función o funciones efectoras de la toxina Shiga.

Aunque algunos epítomos antigénicos y/o inmunogénicos pueden ser eliminados por truncamiento, el principal desafío es silenciar epítomos dentro de dominios efectores del polipéptido de la toxina Shiga, por ejemplo, su dominio enzimático, a la vez que se conservan las funciones efectoras de la toxina Shiga deseadas, por ejemplo, la potente inhibición de ribosomas y dirigir el enrutamiento subcelular. Aunque estos epítomos internos pueden disminuirse o abolirse mediante mutación y/o modificación química, el reto es hacerlo conservando al mismo tiempo las funciones efectoras de toxina Shiga. Es un reto significativo alterar sitios antigénicos por sustitución de aminoácidos en una proteína conservando al mismo tiempo la función de proteínas porque los residuos y estructuras funcionalmente limitados deben mantenerse y ciertas posiciones no toleran ciertas sustituciones de aminoácidos sin afectar a la estructura, la estabilidad y/o función de la proteína (véase Cantor J et al, *Methods in Enzymology* 502: Capítulo 12 pág. 291-301 (2012)).

Se llevó a cabo una extensa experimentación empírica sobre regiones de polipéptido derivadas de toxina Shiga para llegar a la presente invención. Tal como se describe en más detalle en los Ejemplos, se crearon sustituciones de aminoácidos en epítomos de células B predichas, y los polipéptidos resultantes se ensayaron para la retención de las funciones efectoras de la toxina Shiga deseadas. La antigenicidad y/o inmunogenicidad de cada epítomo se prevé que se reduce o elimina mediante las sustituciones de aminoácidos proporcionadas, que a su vez reduce la antigenicidad y/o inmunogenicidad general de cualquier composición de materia que comprende al menos una alteración de epítomo proporcionado. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizada que fueron identificados por tener un potencial inmunogénico reducido mientras se mantenían una función o funciones de la toxina Shiga, no eran previsible a priori, a pesar de los intentos de desinmunización de toxinas proteicas bacterianas lejanamente relacionadas, tales como exotoxina A de *Pseudomonas*.

Los polipéptidos que comprenden regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas de la presente invención se pueden utilizar como componentes de inmunotoxinas recombinantes y fusiones de ligando-toxina para la eliminación selectiva de tipos de células específicos y el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, trastornos inmunitarios y las infecciones microbianas. Además, los polipéptidos de la presente invención se pueden usar como componentes de moléculas de internalización específicas del tipo de célula para la administración precisa de materiales exógenos, tales como agentes promotores de la detección para la recogida de información de diagnóstico. Además, los polipéptidos de la presente invención, independientemente o como componentes de holotoxinas Shiga, se pueden utilizar en materiales de inmunización diseñados para evitar la creación de anticuerpos para epítomos específicos, a la vez que se obtienen respuestas inmunes a las toxinas Shiga.

I. La estructura general de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y proteínas de la presente invención

La presente invención proporciona diversos polipéptidos que comprenden regiones efectoras de toxina Shiga con un potencial inmunogénico reducido, pero que retienen una funcionalidad o funcionalidades efectoras de la toxina Shiga seleccionadas de internalización celular, enrutamiento subcelular, actividad catalítica, y la citotoxicidad; tal como se define en las reivindicaciones. Un polipéptido de la presente invención comprende una región efectora de la toxina Shiga, tal como se define en las reivindicaciones. Una proteína de la presente invención comprende una región efectora de la toxina Shiga desinmunizada, tal como se define en las reivindicaciones y una región de unión que comprende uno o más polipéptidos capaces de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular.

La familia de toxinas Shiga de toxinas proteicas se compone de varias toxinas de origen natural que están estructuralmente y funcionalmente relacionadas, por ejemplo, toxina Shiga, toxina similar a Shiga 1 y toxina similar a Shiga 2 (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparten la misma estructura general y el mecanismo de acción (Engedal, N et al, Microbial Biotech. 4: 32-46 (2011)). Por ejemplo, Stx, SLT-1 y SLT-2 muestran una actividad enzimática indistinguible en sistemas libres de células (Head S et al, J Biol Chem. 266: 3617-21 (1991); Tesh V et al, Infect Immun 61: 3392-402 (1993); Brigotti M et al, Toxicon 35: 1431-1437 (1997)).

A. Polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados

Para los propósitos de la presente invención, la frase "región efectora de la toxina Shiga" se refiere a una región polipeptídica derivada de una subunidad A de la toxina Shiga de un miembro de la familia de toxinas Shiga que es capaz de mostrar al menos una función de la toxina Shiga. Las funciones de toxina Shiga incluyen, por ejemplo, entrada en la célula, la deformación de la membrana lipídica, dirigir el enrutamiento subcelular, evitar la degradación, inactivar catalíticamente ribosomas, efectuar la citotoxicidad y efectuar efectos citostáticos.

Tal como se usa en el presente documento, la retención de una función efectora de la toxina Shiga "significativa" se refiere a un nivel de actividad funcional de la toxina Shiga, tal como se mide por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad comparable a un control de polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje (WT). Para la inhibición *in vitro* de ribosoma, una función efectora de la toxina Shiga significativa es mostrar una IC₅₀ de 300 pM o menos dependiendo de la fuente de los ribosomas (por ejemplo, bacterias, arqueas o eucariotas (algas, hongos, plantas o animales)). Esta es una inhibición significativamente mayor en comparación con la IC₅₀ aproximada de 100000 pM para el doble mutante SLT-1A 1-251 catalíticamente inactivo (Y77S,E167D). Para la citotoxicidad en un ensayo de eliminación de células positivas diana en un cultivo de células de laboratorio, una función efectora de la toxina Shiga significativa es mostrar una CD₅₀ de 100, 50, o 30 nM o menos, dependiendo de la línea celular y su expresión de la biomolécula diana extracelular apropiada. Esta es una citotoxicidad significativamente mayor para la línea celular diana apropiada en comparación con SLT-1A sola, sin una región de unión de reconocimiento celular, que tiene una CD₅₀ de 100-10.000 nM, dependiendo de la línea celular.

Para algunas muestras, los valores exactos, ya sea para IC₅₀ o CD₅₀, podrían ser imposibles de obtener debido a la incapacidad para recoger los puntos de datos requeridos para una curva de ajuste preciso. Valores de IC₅₀ y/o CD₅₀ inexactos no deben considerarse cuando se determina la actividad de la función efectora de la toxina Shiga significativa. Datos insuficientes para adaptar con precisión una curva, tal como se describe en el análisis de los datos de ensayos de la función efectora de la toxina Shiga de ejemplo, tales como, por ejemplo, ensayos descritos en los ejemplos, no deben considerarse como representativos de la función efectora real de la toxina Shiga. Por ejemplo, en

teoría, ni IC₅₀ ni CD₅₀ se pueden determinar si no se produce más del 50% de inhibición de ribosomas o muerte celular, respectivamente, en una serie de concentraciones para una muestra determinada.

El fracaso para detectar la actividad en la función efectora de la toxina Shiga puede ser debido a la expresión inadecuada, el plegamiento del polipéptido y/o la estabilidad del polipéptido en lugar de la falta de entrada celular, direccionamiento subcelular y/o actividad enzimática. Los ensayos para las funciones efectoras de la toxina Shiga pueden no requerir mucho polipéptido de la invención para medir cantidades significativas de actividad de la función efectora de la toxina Shiga. En la medida en que una causa subyacente de función efectora baja o nula se determine empíricamente para relacionarse con la expresión o la estabilidad de la proteína, un experto en la técnica puede ser capaz de compensar tales factores utilizando química de proteínas y técnicas de ingeniería molecular conocidas en la técnica, de tal manera que se puede restaurar y medir una actividad efectora funcional de la toxina Shiga. Como ejemplos, la expresión basada en células inadecuada puede ser compensada mediante el uso de diferentes secuencias de control de expresión; el plegamiento y/o estabilidad del polipéptido inadecuados se pueden beneficiar de la estabilización de secuencias terminales, o mutaciones compensatorias en regiones no efectoras que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína, etc. Cuando están disponibles nuevos ensayos para funciones individuales de la toxina Shiga, los polipéptidos efectoras de la toxina Shiga desinmunizados pueden analizarse para cualquier nivel de estas funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como tienen 1.000 veces o 100 veces o menos actividad de un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje (WT) o muestran de 3 veces a 30 veces o más actividad en comparación con un polipéptido efector de la toxina Shiga knock-out funcional.

Ciertas funciones efectoras de la toxina Shiga no son fácilmente medibles, por ejemplo, la actividad de direccionamiento subcelular. Actualmente no hay ninguna rutina, ensayo cuantitativo para distinguir si el fracaso de un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado para ser citotóxico es debido a un direccionamiento subcelular inadecuado, pero en el momento que estas pruebas estén disponibles, los polipéptidos efectoras de la toxina Shiga desinmunizados se pueden analizar para cualquier nivel significativo de enrutamiento subcelular en comparación con la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje apropiado.

Cabe señalar que incluso si la citotoxicidad de un polipéptido efector de toxina Shiga se reduce en relación con el de tipo salvaje, en la práctica, las aplicaciones que utilizan polipéptidos efectoras de la toxina Shiga desinmunizada pueden ser igual o más eficaces que las que utilizan polipéptidos efectoras de la toxina Shiga de tipo salvaje (WT) porque la antigenicidad y/o inmunogenicidad reducidas podrían compensar la citotoxicidad reducida, tal como, por ejemplo, permitiendo dosis más altas o administraciones más repetidas. Los polipéptidos efectoras de la toxina Shiga de tipo salvaje (WT) son muy potentes, son capaces de matar con sólo una molécula que alcanza el citosol o tal vez se internalizan 40 moléculas. Los polipéptidos efectoras de la toxina Shiga desinmunizados, con incluso funciones efectoras de la toxina Shiga considerablemente reducidas, tales como, por ejemplo, enrutamiento subcelular o citotoxicidad, en comparación con los polipéptidos efectoras de la toxina Shiga de tipo salvaje todavía puede ser lo suficientemente potente como para aplicaciones prácticas que implican la destrucción de células diana y/o la detección de células específicas.

La familia de toxinas Shiga abarca la toxina Shiga verdadera (Stx) aislada de *S. dysenteriae* serotipo 1, variantes de toxina similar a Shiga 1 (SLT1 o Stx1 o SLT-1 o SlT-1) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica, y variantes de toxina similar a Shiga 2 (SLT2 o Stx2 o SLT-2) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica. SLT1 difiere por sólo un residuo de Stx, y ambos han sido referidos como Verocitotoxinas o Verotoxinas (VT) (O'Brien, Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)). Aunque las variantes SLT1 y SLT2 son sólo aproximadamente un 53-60% similares entre sí a nivel de secuencia de aminoácidos, comparten mecanismos de la actividad enzimática y la citotoxicidad comunes a los miembros de la familia de toxinas Shiga (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Más de 39 toxinas Shiga diferentes se han descrito, tal como los subtipos definidos Stx1a, Stx1c, Stx1d y Stx2a-g (Scheutz F et al, J Clin Microbiol. 50: 2951-63 (2012)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga no se limitan, naturalmente, a ninguna especie bacteriana porque los genes que codifican la toxina Shiga pueden propagarse entre especies bacterianas a través de transferencia horizontal de genes (Strauch E et al, Infect Immun 69: 7588-95 (2001); Zhaxybayeva O., Doolittle W, Curr Biol 21: R242-6 (2011)). Como ejemplo de transferencia entre especies, se descubrió una toxina Shiga en una cepa de *A. haemolyticus* aislada de un paciente (Grotiuz G et al, J Clin Microbiol. 44: 3838-41 (2006)). Una vez que un polinucleótido que codifica la toxina Shiga entra en una nueva subespecie o especie, la secuencia de aminoácidos de la toxina Shiga presumiblemente es capaz de desarrollar ligeras variaciones en la secuencia debido a la deriva genética y/o presión selectiva manteniendo al mismo tiempo un mecanismo de citotoxicidad común a los miembros de la familia de toxinas Shiga (ver Scheutz, J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)).

Los polipéptidos de la presente invención comprenden regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de una subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga con al menos una posible región de epítipo alterada con el fin de reducir el potencial antigénico y/o inmunogénico de los polipéptidos después de la administración a un mamífero, tal como se define en las reivindicaciones. El término "alterada" o "alteración" como se usa en el presente documento con respecto a una región de epítipo se refiere a la supresión de al menos un aminoácido en una región de epítipo, la inversión de dos o más aminoácidos en los que al menos uno de los aminoácidos invertidos está en una región del epítipo, la inserción de al menos un aminoácido en una región de epítipo, y la mutación de al menos un aminoácido en una región de epítipo. Una alteración de región epítipo por mutación incluye sustituciones de aminoácidos por aminoácidos no estándar y/o aminoácidos no naturales. Las regiones de epítipo pueden alternativamente ser

alteradas por mutaciones que comprenden la modificación de un aminoácido mediante la adición de una estructura química unida covalentemente que enmascara al menos un aminoácido en una región de epítipo, véase, por ejemplo de PEGilación (véase Zhang C et al., *BioDrugs* 26: 209-15 (2012) y moléculas pequeñas adyuvantes (Flower D, *Expert Opin Drug Discov* 7: 807-17 (2012)).

5 Ciertas regiones de epítipos y alteraciones se indican en el presente documento por referencia a las posiciones de aminoácidos específicos de las subunidades A de la toxina Shiga nativa proporcionadas en el Listado de Secuencias, señalando que las subunidades A de la toxina Shiga natural pueden comprender formas precursoras que contienen
10 secuencias de señal de aproximadamente 22 aminoácidos en sus extremos aminoterminales que se eliminan para producir subunidades A de toxina Shiga maduras y son reconocibles para el experto. Además, ciertas alteraciones de la región de epítipo se indican en el presente documento por referencia a aminoácidos específicos (por ejemplo, S para un residuo de serina) presentes de forma nativa en posiciones específicas dentro de las subunidades A de la toxina Shiga nativa (por ejemplo, S33 para el residuo serina en la posición 33 desde el extremo amino) seguido por el aminoácido con el que ese residuo ha sido sustituido en la mutación particular bajo discusión (por ejemplo S33I
15 representa la sustitución de aminoácido de isoleucina por serina en el residuo de aminoácido 33 desde el extremo amino terminal).

Ciertas realizaciones de la descripción proporcionan polipéptidos que comprenden una región efectora de la toxina Shiga que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una subunidad A de un miembro de la familia de la toxina Shiga, comprendiendo la región efectora de la toxina Shiga una alteración de al menos una región de epítipo proporcionada en el presente documento (véase por ejemplo las Tablas 1, 2 y 3). Los polipéptidos de región efectora de la toxina Shiga desinmunizados descritos en este documento pueden comprender o consistir esencialmente en la subunidad A de la toxina Shiga de longitud completa (por ejemplo, SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), o SLT-2A (SEQ ID NO: 3)) que comprende al menos una alteración de la secuencia de aminoácidos seleccionada de
20 entre el grupo de aminoácidos posicionados de forma nativa que consiste en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de la SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 94-115 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de la SEQ ID NO: 3; 179-190 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de la SEQ ID NO: 3; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 210-218 de la SEQ ID NO: 3; 240-258 de la SEQ ID NO: 3; 243-257 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de la SEQ ID NO: 3; 281-297 de la SEQ ID NO: 3; y 285 a 293 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o la posición equivalente en un polipéptido efector de la toxina Shiga conservado y/o secuencia de polipéptido efector de toxina Shiga no nativa.

35 En ciertas realizaciones, un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de la descripción puede comprender o consistir esencialmente en una subunidad A de la toxina Shiga truncada. Los truncamientos de las subunidades A de la toxina Shiga podrían dar lugar a la eliminación de regiones enteras de epítipo sin afectar a la actividad catalítica y la citotoxicidad efectora de la toxina. El fragmento de la subunidad A de la toxina Shiga más pequeño que presenta actividad enzimática significativa es un polipéptido compuesto de residuos 75-247 de stxA (Al-Jaufy, *Infect Immun* 62: 956-60 (1994)). Truncando el carboxi-terminal de SLT-1A, stxA, o SLT-2A a los aminoácidos 1-251 elimina dos regiones de epítipo de células B predichas, dos epítipos de células T (CD4+) positivas de CD4 predichos, y un epítipo de células B discontinuo predicho. Truncando el extremo amino terminal de SLT-1A, stxA, o SLT-2A a 75-293 elimina al menos tres regiones de epítipo de células B predichas y tres epítipos de células T CD4+ predichos. Truncar ambos extremos amino y carboxi terminales de SLT-1A, stxA, o SLT-2A a 75-251 elimina al menos cinco regiones de epítipo de células B predichas, cuatro posibles epítipos de células T CD4+ y un epítipo de células B discontinuo predicho.

Un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de la presente invención puede comprender o consistir esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con las sustituciones, en una región de epítipo proporcionado, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones de la descripción, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una delección de al menos un aminoácido dentro de la región del epítipo. En ciertas realizaciones de la descripción, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una inserción de al menos un aminoácido dentro de la región de epítipo. En ciertas realizaciones de la descripción, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una inversión de aminoácidos, en los que al menos un aminoácido invertido está dentro de la región de epítipo. En ciertas realizaciones de la descripción, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una mutación, tal como una sustitución de aminoácido a un aminoácido no estándar o un aminoácido con una cadena lateral modificada químicamente. Numerosos ejemplos de sustituciones de un solo aminoácido se proporcionan en los Ejemplos.

60 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la región efectora de toxina Shiga de la descripción pueden comprender o consistir esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con una o más mutaciones en comparación con la secuencia nativa, que comprende al menos una sustitución de aminoácido seleccionada entre el grupo que consiste en: A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H y K. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con una única mutación en comparación con la secuencia nativa, en la que la sustitución se selecciona de entre el grupo que consiste en: D a A, D a G, D a V, D a L, D a I, D a F, D a S, D a Q, E a A, E a G, E a V, E a L, E a I, E a F, E a S, E a Q, E a N, E a D, E a H, E a R, G a A, H a A, H a G, H a V, H a L, H a I, H a F, H

a M, K a A, K a G, K a V, K a L, K a I, K a M, K a H, L a A, L a G, N a A, N a G, N a V, N a L, N a I, N a F, P a A, P a G, P a F, R a A, R a G, R a V, R a L, R a I, R a F, R a M, R a Q, R a S, R a K, R a H, S a A, S a G, S a V, S a L, S a I, S a F, S a M, T a A, T a G, T a V, T a L, T a I, T a F, T a M, T a S, Y a A, Y a G, Y a V, Y a L, Y a I, Y a F e Y a M.

5 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga de la descripción comprenden o consisten esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con una o más mutaciones en comparación con la secuencia de residuos de aminoácidos nativa, que comprende al menos una sustitución de aminoácidos dentro de una región del epítipo, en la que al menos una sustitución se produce en el grupo de aminoácidos situado de forma nativa seleccionada del grupo que consiste en: 1 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 8 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 9 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 11 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 33 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 49 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 59 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 60 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 96 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 109 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 110 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; SE 147 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 179 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 180 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 185 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 3; 248 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de la SEQ ID NO: 3; 251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 265 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

30 En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga de la descripción comprenden o consisten esencialmente en una subunidad A de la toxina Shiga de longitud completa o truncada con al menos una sustitución dentro de una región del epítipo, en el que la sustitución de al menos un aminoácido es a un aminoácido no conservador (véase, por ejemplo, la Tabla B, *infra*) con respecto a un aminoácido que se produce de forma nativa situado en una de las siguientes posiciones nativas: 1 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 8 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 9 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 11 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 33 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 49 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 59 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 60 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 96 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 109 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 110 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; SE 147 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 179 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 180 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 185 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 3; 248 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de la SEQ ID NO: 3; 251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 265 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

55 En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga de la descripción comprenden o consisten esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; S8 a A, G, V, I, L, M, y M; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F, y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; S33 a A, G, V, L, I, F, y M; S45 a A, G, V, L, I, F, y M; T45 a A, G, V, L, I, F, y M; D47 a A, G, V, L, I, F, S y Q; N48 a A, G, V, L y M; L49 a A o G; D53 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; D58 a A, G, V, L, I, F, S y Q; P59 a A, G, y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; D94 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; S96 a A, G, V, I, L, F y M; S109 a A, G, V, I, L, F, y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F y M; G147 a A; R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; S186 a A, G, V, I, L, F y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S189 a A, G, V, I, L, F y M; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga de la descripción comprenden o consisten esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos K1M, T4I, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, S33I, S45I, T45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55V, R55L, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, T109V, G110A, S112V, G147A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R204A, R205A, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, D264A, G264A, T286A y/o T286I. Estas sustituciones que alteran el epítipo se pueden combinar para formar un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado con múltiples sustituciones por región de epítipo y/o múltiples regiones de epítipo alteradas, al tiempo que se conserva la función efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, las sustituciones en los residuos posicionados de forma K1, T4, S8, T8, T9, S9, K11, K11, S33, S45, T45, D47, N48, L49, D53, R55, D58, P59, E60, E61, G62, D94, S96I, S109, T109, G110, S112, G147, R179, T180, T181I, D183, D184, L185, S186, S186, G187, R188, S189, R204A, R205, S247, Y247, R248, R250, R251, D264, G264, T286 y/o T286 se puede combinar, cuando sea posible, con las sustituciones en los residuos posicionados de forma nativa K1, T4, S8, T8, T9, S9, K11, K11, S33, S45, T45, D47, N48, L49, D53, R55, D58, P59, E60, E61, G62, D94, S96I, S109, T109, G110, S112, G147, R179, T180, T181I, D183, D184, L185, S186, S186, G187, R188, S189, R204A, R205, S247, Y247, R248, R250, R251, D264, G264, T286 y/o T286 para crear un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la descripción.

Los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga de la presente invención comprenden o consisten esencialmente en una subunidad A de la toxina Shiga truncada que es más corta que una subunidad A de la toxina Shiga de longitud completa, en los que al menos un aminoácido se altera en una región de epítipo posicionada de forma nativa proporcionado en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4 y/o 5), tal como se define en las reivindicaciones. Los truncamientos de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 son catalíticamente activos, capaces de inactivar los ribosomas enzimáticamente *in vitro*, y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). El fragmento de subunidad A de la toxina Shiga más pequeño que presenta actividad enzimática completa es un polipéptido compuesto de residuos 1-239 de SLT1A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque el fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que se indicó que retenía la actividad catalítica sustancial fueron los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)), un truncamiento de StxA expresado *de novo* dentro de una célula eucariota requiere sólo hasta el residuo 240 para alcanzar el citosol y ejercer la inactivación catalítica de ribosomas (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Aunque los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada de la descripción pueden comúnmente ser más pequeños que la subunidad A de longitud completa, se prefiere que la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada mantenga la región de polipéptido desde la posición de aminoácido 77 a 239 (SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2)) o el equivalente en otras subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga (por ejemplo, 77 a 238 del (SEQ ID NO: 3)). En realizaciones de la presente invención, los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga derivados de SLT-1A comprenden o consisten esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 1 en los que al menos un aminoácido está alterado en las regiones de epítipo posicionadas de forma nativa proporcionadas en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5), tal como se define en las reivindicaciones. Las regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas derivadas de StxA pueden comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 2, 1 a 241 de SEQ ID NO: 2, 1 a 251 de SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 2, en las que al menos un aminoácido está alterado en al menos una región de epítipo posicionada de forma nativa proporcionada en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5). Las regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de SLT-2 pueden comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 3, 1 a 241 de SEQ ID NO: 3, 1 a 251 de SEQ ID NO: 3, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 3, en las que al menos un aminoácido está alterado en al menos una región de epítipo posicionada de forma nativa proporcionada en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5).

La invención proporciona además variantes de los polipéptidos de la invención, en las que la región efectora de la toxina Shiga difiere de una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural en solo o hasta en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más residuos de aminoácidos (pero en no más de los que retiene al menos 95%, 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos). Por lo tanto, un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de la invención derivado de una subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga puede comprender adiciones, deleciones, truncamientos, u otras alteraciones de la secuencia original, siempre y cuando al menos 95%, 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos se mantenga con respecto a una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural y al menos un aminoácido está alterado en al menos una región de epítipo posicionada de forma nativa proporcionada en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5), tal como se define en las reivindicaciones.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98 %, 99%, 99,5% o 99,7% de identidad de secuencia global con respecto a una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural, tal como SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2) y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3), en los que al menos un aminoácido está alterado en al menos una región de epítipo posicionada de forma nativa proporcionada en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5).

Opcionalmente, una versión de longitud completa o truncada de la subunidad A de la toxina Shiga puede comprender una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones, inserciones o inversiones), siempre que al menos un aminoácido está alterado en al menos una región de epítipo posicionada de forma nativa proporcionada en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5). Se prefiere, en ciertas realizaciones de la invención, que los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados tengan suficiente identidad de secuencia con una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural para retener la citotoxicidad después de la entrada en una célula, ya sea por procedimientos bien conocidos de transformación, la transfección, la infección o inducción de la célula huésped, o mediante la internalización mediada por la región de unión dirigida a célula unida con el polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga. Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades A de la toxina Shiga han sido asignadas a las siguientes posiciones de residuos: asparagina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170 y la arginina-176 entre otras (Di, Toxicon 57: 525-39 (2011)). En cualquiera de las realizaciones de la invención, los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados pueden, preferiblemente, pero no necesariamente, mantener uno o más aminoácidos conservados en las posiciones, tales como las que se encuentran en las posiciones 77, 167, 170, y 176 en StxA, SLT-1A o la posición conservada equivalente en otros miembros de la familia de toxinas Shiga que normalmente se requieren para la actividad citotóxica. La capacidad de una proteína citotóxica de la invención para causar la muerte celular, por ejemplo, su citotoxicidad, se puede medir utilizando uno cualquiera o más de una serie de ensayos bien conocidos en la técnica.

B. Proteínas que comprenden regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas

Las proteínas de la presente invención comprenden una región efectora de la toxina Shiga de-inmunizado que comprende un polipéptido de la presente invención como se define en las reivindicaciones vinculadas a una región de unión específica extracelular biomolécula diana. Regiones de unión de las proteínas de la presente invención comprenden uno o más polipéptidos capaces de manera selectiva y unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular. Regiones de unión pueden comprender uno o más diversos restos de polipéptidos, tales como ligandos ya sea sintético o de origen natural ligandos y derivados de los mismos, dominios de inmunoglobulina derivada, sintéticamente diseñados andamios como alternativas a la inmunoglobulina dominios, y similares.

Existen numerosas regiones de unión conocidos en la técnica que son útiles para la orientación polipéptidos a tipos de células específicas a través de sus características de unión, tales como ligandos, anticuerpos monoclonales, derivados de anticuerpos por ingeniería genética, y alternativas de ingeniería a los anticuerpos.

Según una específica, pero aspecto no limitativo, la región de unión de la proteína de la presente invención comprende un ligando o derivado de la misma de origen natural que conserva la funcionalidad de unión a un biomolécula diana extracelular, comúnmente un receptor de superficie celular. Por ejemplo, diversas citocinas, factores de crecimiento y hormonas conocidos en la técnica se pueden usar para dirigir la proteína citotóxica a la superficie celular de tipos específicos de células que expresan un receptor afín de citoquinas, receptor de factor de crecimiento o receptor de la hormona. Ciertos ejemplos no limitativos de ligandos incluyen (nombres alternativos se indican entre paréntesis) de células B que activan factores (BAFFs, APRIL), factores estimulantes de colonias (CSF), el crecimiento epidérmico factores (EGFs), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), endotelial vascular factores de crecimiento (VEGF), factores de crecimiento de tipo insulínico (IGF), interferones, interleucinas (tales como IL-2, IL-6, y IL-23), factores de crecimiento nervioso (NGF), derivados de plaquetas factores de crecimiento, factores de crecimiento transformantes (TGF), y factores de necrosis tumoral (TNF).

Según ciertas otras realizaciones, la región de unión comprende un ligando sintético capaz de unirse a un biomolécula diana extracelular. Un ejemplo no limitativo es antagonistas a citotóxica antígeno de linfocitos T 4 (CTLA-4).

Según un aspecto específico, pero no limitativo, la región de unión puede comprender una región de unión de tipo inmunoglobulina. La "región de unión de tipo inmunoglobulina" tal como se utiliza aquí, se refiere a una región de polipéptido capaz de unirse a una o más biomoléculas diana, tales como un antígeno o epítipo. Regiones de unión pueden ser funcionalmente definen por su capacidad para unirse a moléculas diana. Regiones de unión de tipo inmunoglobulina se derivan comúnmente de estructuras de anticuerpo o anticuerpos similares; sin embargo, andamios alternativas de otras fuentes se contemplan dentro del alcance del término.

La inmunoglobulina (Ig) de proteínas tienen un dominio estructural conocido como un dominio de Ig. Dominios Ig varían en longitud desde alrededor de 70-110 residuos de aminoácidos y poseen una característica Ig veces, en la que típicamente de 7 a 9 hebras beta antiparalelas ordenar en dos láminas beta, que forman una estructura tipo sándwich. El pliegue Ig se estabiliza mediante interacciones de aminoácidos hidrófobos en las superficies interiores de la sándwich y altamente conservada de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína en las hebras. Dominios de Ig pueden ser variables (IGV o V-set), constante (IgC o C-set) o intermedio (GII o I-set). Algunos dominios de Ig pueden estar asociados con una región determinante de la complementariedad (CDR), que es importante para la especificidad de anticuerpos de unión a sus epítipos. Dominios de tipo Ig también se encuentran en proteínas no inmunoglobulinas y se clasifican sobre esa base como miembros de la superfamilia de Ig de las proteínas. El hgnc (HGNC) proporciona una lista de los miembros de la familia que contiene el dominio de tipo Ig.

Una región de unión de tipo inmunoglobulina puede ser una secuencia de polipéptido de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la secuencia de aminoácidos se ha variado de la de un anticuerpo nativo o un dominio similar a Ig de una proteína no inmunoglobulina, por ejemplo, mediante ingeniería molecular o la selección por selección de la biblioteca. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante y en el cribado de biblioteca *in vitro* en la generación de regiones de unión de tipo inmunoglobulina, los anticuerpos pueden ser rediseñados para obtener las características deseadas, tales como el tamaño más pequeño, entrada en la célula, o de otras mejoras terapéuticas. Las variaciones posibles son muchas y pueden variar desde el cambio de un solo aminoácido al rediseño completo de, por ejemplo, una región variable. Típicamente, los cambios en la región variable se realizarán con el fin de mejorar las características de unión a antígeno, mejorar la estabilidad de la región variable, o reducir la posibilidad de respuestas inmunitarias.

Existen numerosas regiones de unión de tipo inmunoglobulina contemplan como componentes de la presente invención. En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión de tipo inmunoglobulina, tal como un paratopo anticuerpo capaz de unirse a un biomolécula diana extracelular. En ciertas otras realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido de ingeniería no derivarse de cualquier dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión al proporcionar la unión a un biomolécula diana extracelular de alta afinidad de la inmunoglobulina. Este polipéptido de ingeniería puede incluir opcionalmente andamios polipéptido que comprende o que consiste esencialmente de las regiones determinantes de la complementariedad de las inmunoglobulinas, como se describe en el presente documento.

También hay numerosas regiones de unión de la técnica anterior que son útiles para la orientación polipéptidos a tipos de células específicas a través de sus características de unión de alta afinidad. En ciertas realizaciones, la región de unión de las presentes proteínas se selecciona entre el grupo que incluye los dominios de un solo dominio de anticuerpo (sdAbs), nanocuerpos, dominios de anticuerpo de cadena pesada derivados de camélidos (V_H fragmentos H), nanoanticuerpos bivalentes, de cadena pesada dominios de anticuerpos derivadas de peces cartilagosos, la inmunoglobulina nuevos receptores de antígenos (IgNARs), V_{NAR} fragmentos, variable de cadena única (scFv), multimerizar fragmentos scFv (diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos), en tándem biespecífico fragmentos scFv, estabilizado con disulfuro variable de anticuerpo (Fv fragmentos), estabilizado con disulfuro fragmentos de unión a antígeno (Fab) que consisten en dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} , F(ab')₂ divalente, fragmentos Fd que consiste en la cadena pesada y C_{H1} dominios, de cadena sencilla Fv- C_{H3} minicuerpos, minicuerpos biespecíficos, dimérica C_H fragmentos 2 de dominio (C_{H2D}), de unión a antígeno dominios Fc (Fcabs), 3 fragmentos aislados complementarios región determinante de (CDR3), constreñido región marco 3, CDR3, región marco 4 (FR3-CDR3-FR4) polipéptidos, dominios pequeños immunopharmaceutical modular (SMIP), y cualquier homólogos genéticamente manipuladas de los anteriores que retienen su paratopo y función de unión (ver Saerens D et al., *Curr. Opin. Pharmacol* 8: 600-8 (2008); Dimitrov D, *MAbs* 1: 26-8 (2009); Weiner L, *Cell* 148: 1081-4 (2012); . Ahmad Z et al, *Clin Dev Immunol* 2012: 980 250 (2012)).

Según ciertas otras realizaciones, la región de unión incluye la ingeniería, andamios alternativas a la inmunoglobulina dominios que exhiben características funcionales similares, tales como de alta afinidad y unión de biomoléculas diana específico, y permite la ingeniería de características mejoradas, tales como mayor estabilidad o inmunogenicidad reducida. Para ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la región de unión se selecciona entre el grupo que incluye la ingeniería, fibronectina derivados, 10^o fibronectina tipo III (10Fn3) dominio (monocuerpos, AdNectins™, o AdNexins™); ingeniería, Tipo tenascina tenascin-derivado dominio III (Centryns™); ingeniería, repetición de anquirina motivo que contiene polipéptido (DARPs™); ingeniería, de baja densidad de lipoproteínas-receptor-derivado, un dominio (LDLR-A) (Avimers™); lipocalina (anticalinas); ingeniería, derivados de inhibidor de proteasa, dominio Kunitz; ingeniería, derivado de proteína-A, dominio Z (aficuerpos™); ingeniería, gamma-B andamio crystallin derivados de o construida, andamio ubiquitina-derivado (Affilins); Polipéptidos (Nanoffitins® o affitins) Sac7d derivados; ingeniería, Fyn-derivado, dominio SH2 (Fynomers®); miniproteínas; Andamios de dominio similares a lectina de tipo C; ingeniería miméticos de anticuerpos; y cualesquiera homólogos genéticamente manipuladas de lo anterior que conserva su funcionalidad de unión (Wörn A, Plückthun A, *J Mol Biol* 305: 989-1010 (2001); Xu L et al, *Chem Biol*. 9: 933-42 (2002); Wikman M et al, *Protein Eng Des Sel*. 17: 455-62 (2004); Binz H et al, *Nat Biotechnol*. 23: 1257-1268 (2005); Hey T et al, *Trends Biotechnol* 23: 514-522 (2005); Holliger P, Hudson P, *Nat Biotechnol* 23: 1126-1136 (2005); Gill D, Damle N, *Curr Opin Biotech* 17: 653-8 (2006); Koide A, Koide S, *Methods Mol Biol* 352: 95-109 (2007); Byla P et al, *J Biol Chem* 285: 12 096 (2010); Zoller F et al, las moléculas 16: 2467-85 (2011)).

Cualquiera de las regiones de unión anteriores se puede utilizar como un componente de la presente invención siempre que el componente de la región de unión tiene una constante de disociación de 10⁻⁵ a 10⁻¹² moles por litro, preferiblemente menos que 200 nanomolar (nM), hacia una biomolécula diana extracelular.

Biomoléculas diana extracelulares

La región de unión de la proteína de la invención comprende una región de polipéptido capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular, preferiblemente que está físicamente acoplada a la superficie de un tipo de célula de interés, tal como una célula de cáncer, célula tumoral, célula plasmática, célula infectada, o célula huésped que alberga un patógeno intracelular.

El término "biomolécula diana" se refiere a una molécula biológica, comúnmente una proteína o una proteína modificada por modificaciones post-traduccionales, tales como glicosilación, que es capaz de unirse mediante una región de unión para dirigir una proteína a un tipo de célula o localización específica dentro de un organismo. Las biomoléculas diana extracelulares pueden incluir varios epítomos, incluyendo polipéptidos no modificados, polipéptidos modificados por la adición de grupos funcionales bioquímicos y glicolípidos (véase por ejemplo la patente de Estados Unidos 5.091.178; EP 2431743). Es deseable que una biomolécula diana extracelular se internalice endógenamente o se fuerce fácilmente para internalizar tras la interacción con una molécula de la invención.

Para los propósitos de la presente invención, el término "extracelular" con respecto a la modificación de una biomolécula diana se refiere a una biomolécula que tiene al menos una parte de su estructura expuesta al medio extracelular. Las biomoléculas diana extracelulares incluyen componentes de la membrana celular, proteínas de la zona transmembrana, biomoléculas ancladas a la membrana de las células, biomoléculas unidas a la superficie celular y biomoléculas secretadas.

Con respecto a la presente invención, la frase "acoplada físicamente" cuando se usa para describir una biomolécula diana significa interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan la biomolécula diana, o una parte de la misma, al exterior de una célula, tal como una pluralidad de interacciones no covalentes entre la biomolécula diana y la célula, donde la energía de cada interacción individual es del orden de aproximadamente 1-5 kilocalorías (por ejemplo, enlaces electrostáticos, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, fuerzas hidrofóbicas, etc.). Todas las proteínas integrales de membrana se pueden encontrar acopladas físicamente a una membrana celular, así como proteínas de membrana periféricas. Por ejemplo, una biomolécula diana extracelular podría comprender una región de la zona transmembrana, un anclaje lipídico, un anclaje de glicolípidos, y/o puede asociarse no covalentemente (por ejemplo, a través de interacciones hidrofóbicas no específicas y/o interacciones de unión de lípidos) con un factor que comprende cualquiera de los anteriores.

Las regiones de unión de las proteínas de la invención pueden diseñarse o seleccionarse en base a numerosos criterios, tales como la expresión específica del tipo de célula de sus biomoléculas diana y/o la localización física de sus biomoléculas diana con respecto a tipos de células específicas. Por ejemplo, ciertas proteínas de la presente invención comprenden dominios de unión capaces de unir dianas de la superficie celular que se expresan exclusivamente por un solo tipo de células a la superficie celular. Esto permite que la destrucción de células seleccionadas de tipos de células específicas con una alta preferencialidad (al menos un efecto citotóxico de 3 veces) sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan la biomolécula diana extracelular. Alternativamente, la expresión de la biomolécula diana de la región de unión puede ser no exclusiva para un tipo de célula si la biomolécula diana extracelular se expresa en suficientes cantidades bajas y/o se acopla físicamente en cantidades bajas con tipos de células que no son para ser reconocidas. Esto también permite la destrucción de células seleccionadas de tipos de células específicas con una alta preferencialidad (al menos un efecto citotóxico de 3 veces) sobre tipos de células "espectadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana extracelular o no se acoplan físicamente a significativas cantidades de la biomolécula diana extracelular. Una célula seleccionada pueden destruirse utilizando las proteínas citotóxicas de la presente invención bajo condiciones variadas de la célula, tales como células que incluyen ex vivo, cultivadas in vitro, o in vivo, in situ en sus ubicaciones nativas dentro de un organismo multicelular.

Las biomoléculas diana extracelular de la región de unión de las proteínas de la invención pueden incluir biomarcadores sobreproporcionalmente o exclusivamente presentes en células cancerosas, células inmunitarias y células infectadas con patógenos intracelulares, tales como virus, bacterias, hongos, priones o protozoos.

Regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, uno o más residuos de aminoácidos pueden mutarse, insertarse o suprimirse con el fin de aumentar la actividad enzimática de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada. Por ejemplo, la mutación de la posición del residuo de alanina-231 en StxIA al glutamato aumentó su actividad enzimática in vitro (Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)).

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, uno o más residuos de aminoácido pueden mutarse o suprimirse con el fin de reducir o eliminar la actividad catalítica y/o citotóxica de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizada. La actividad catalítica y/o citotóxica de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede disminuirse o eliminarse mediante la mutación o truncamiento siempre que al menos un aminoácido se altere en al menos una región del epítipo posicionada de forma nativa proporcionada en los Ejemplos (Tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5). Las posiciones marcadas de tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114, y triptófano-203 han demostrado ser importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1, y Stx2 (Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci USA. 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al, Biochemistry 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al, Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al., Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al, Microbiol Immunol. 38: 441-7 (1994); Suhan, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)). La mutación de glutamato-167 y arginina-170 eliminó la actividad enzimática de Slt-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas libre de células (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque utilizando la expresión de novo de Slt-I A1 en el retículo endoplásmico, mutando glutamato-167 y arginina-170 o truncando Slt-I A1 a los residuos 1-239 se eliminó la citotoxicidad del fragmento Slt-I A1 en ese nivel de expresión (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Las proteínas de la presente invención comprenden cada uno un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizado que retiene al menos una función efectora de la toxina Shiga, como se define en las reivindicaciones, pero que se pueden modificar a partir de una molécula parental citotóxica a una proteína con citotoxicidad disminuida o abolida para las funciones no citotóxicas, por ejemplo, efectuar la citostasis, administrar materiales exógenos, y/o la detección de tipos de células, mediante la mutación de uno o más residuos clave para la actividad enzimática. Esta estructura general es modular en que los polipéptidos de la presente invención pueden estar unidos a cualquier número de diversas composiciones de materia, tales como las regiones de unión y/o agentes promotores de detección para diversas aplicaciones tal como se describe en el presente documento.

La inmunogenicidad de una molécula (la capacidad para inducir un anticuerpo y/o respuesta inmunitaria mediada por células) puede evaluarse mediante la observación de cualquier respuesta inmunitaria (anticuerpos y/o mediada por células inmunes) a la molécula después de la administración a un organismo vivo, tal como un cordado. Ciertas respuestas inmunes se pueden medir, tales como la cantidad y la formación de anticuerpos dirigidos específicamente a la molécula administrada con el tiempo. La presencia de anticuerpos que se unen específicamente a la molécula administrada indican 1) la pre-existencia de uno o más anticuerpos que reconocían la molécula administrada y/o 2) la inducción de la formación de novo de uno o más anticuerpos que reconocen la molécula administrada.

La existencia de anticuerpos anti-molécula preformados se puede determinar mediante la investigación del suero de preadministración para la presencia de anticuerpos anti-molécula. La inducción de la formación de novo de anticuerpos anti-"molécula administrada" se puede determinar mediante el control del suero después de la administración de la cantidad de anticuerpos anti-molécula generados con el tiempo.

La cantidad de anticuerpos inducidos en los cordados después de la administración de una molécula (por ejemplo, polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga) se puede medir mediante la comparación de la cantidad de los anticuerpos anti-molécula preadministración con respecto a la cantidad de anticuerpos anti-molécula post-administración. La cantidad de anticuerpos anti-"molécula administrada" inducida en un cordado después de la administración es indicativa de la inmunogenicidad general de la molécula y la capacidad de la molécula de inducir diferentes respuestas inmunes en diversos cordados, tales como la inducción de una producción de anticuerpos anti-molécula aumentada y diversificada después de administración, las respuestas inmunes mediadas por células inmunes, las actividades neutralizantes de moléculas, reacciones de hipersensibilidad, anafilaxia, reacciones anafilactoides y otras respuestas inmunitarias.

Puede ser difícil medir la inmunogenicidad de una molécula débilmente inmunogénica sin un punto de referencia, tal como otra molécula más inmunogénica. La inmunogenicidad relativa de dos moléculas (por ejemplo, un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje y un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizada) pueden evaluarse mediante la observación de las diferencias relativas en anticuerpos anti-molécula producidos por cada molécula, respectivamente, después de la administración de cada molécula individualmente a diferentes organismos. La inducción relativa de la formación de novo de anticuerpos anti-"molécula administrada" se puede determinar mediante la medición de las diferencias relativas en los sueros post-administración para la cantidad de anticuerpos anti-molécula generados con el tiempo, para cada molécula, respectivamente.

La cantidad de anticuerpos inducidos en un cordado, tal como un ratón, tratado con diferentes moléculas (por ejemplo, un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje y un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado) se puede medir con ensayos basados en ELISA estándar y se utiliza para comparar la inmunogenicidad relativa de las diferentes moléculas.

Motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático de un miembro de la familia KDEL

Para los propósitos de la presente invención, la frase "motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático", motivo señal de tipo KDEL, o motivo señal se refiere a cualquier miembro de la familia KDEL capaz de funcionar dentro de una célula eucariota para promover la localización subcelular de una proteína al retículo endoplasmático a través de receptores de KDEL.

La secuencia de lisina-asparagina-glutamato-leucina (KDEL) carboxi terminal (KDEL ("KDEL" descrita como SEQ ID NO: 60) es un motivo señal canónico de retención y recuperación del retículo endoplasmático para proteínas solubles en células eucariotas y es reconocida por los receptores de KDEL (véase, Capitani M, Sallèse M, FEBS Lett 583: 3863-71 (2009), para revisión). La familia KDEL de motivos señal incluye muchos motivos de tipo KDEL, tales como HDEL (SEQ ID NO: 62), RDEL (SEQ ID NO: 64), WDEL (SEQ ID NO: 65), YDEL (SEQ ID NO: 66), HEEL (SEQ ID NO: 68), KEEL (SEQ ID NO: 69), REEL (SEQ ID NO: 70), KFEL (SEQ ID NO: 73), KIEL (SEQ ID NO: 85), DKEL (SEQ ID NO: 86), KKEL (SEQ ID NO: 89), HNEL (SEQ ID NO: 93), HTEL (SEQ ID NO: 94), KTEL (SEQ ID NO: 95) y HVEL (SEQ ID NO: 96), todos los cuales se encuentran en los extremos carboxi terminales de proteínas que se sabe que son residentes del lumen del retículo endoplasmático de organismos de múltiples reinos filogenéticos (Munro S, Pelham H, Cell 48: 899-907 (1987); Raykhel I et al, J Cell Biol. 179: 1193-204 (2007)). La familia de motivos señal de KDEL incluye al menos 46 variantes de polipéptidos mostradas usando construcciones sintéticas (Raykhel, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007)). Los motivos señal de KDEL adicionales incluyen ALEDEL (SEQ ID NO: 106), HAEDEL (SEQ ID

NO: 107), HLEDEL (SEQ ID NO: 108), KLEDEL (SEQ ID NO: 109), IRSDEL (SEQ ID NO: 110), ERSTEL (SEQ ID NO: 111), y RPSTEL (SEQ ID NO: 112) (Alanen H et al, J Mol Biol 409: 291-7 (2011)). Un motivo consenso generalizado que representa la mayoría de los motivos señal de KDEL se ha descrito como [KRHQSA]-[DENQ]-E-L (Hulo N et al, Nucleic Acids Res 34: D227-30 (2006)).

Las proteínas que contienen motivos señal de la familia KDEL están unidos por los receptores KDEL distribuidos por todo el complejo de Golgi y transportados al retículo endoplásmico por un mecanismo dependiente de microtúbulos para su liberación en el lumen del retículo endoplásmico (Griffiths G et al, J Cell Biol 127: 1557-74 (1994); Miesenböck G, Rothman J, J Cell Biol 129: 309-19 (1995)). Los receptores KDEL se ciclan dinámicamente entre el retículo endoplasmático y complejo de Golgi (Jackson M et al, EMBO J 9: 3153-62 (1990); Schütze M et al, EMBO J. 13: 1696-1705 (1994)).

Para los propósitos de la presente invención, los miembros de la familia KDEL incluyen motivos señal sintéticos capaces de funcionar dentro de una célula eucariota para promover la localización subcelular de una proteína al retículo endoplasmático a través de receptores KDEL. En otras palabras, algunos miembros de la familia KDEL podrían no estar presentes en la naturaleza o aún no se han observado en la naturaleza, pero se han construido o se pueden construir y verificar empíricamente usando procedimientos conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Raykhel I et al, J Cell Biol. 179: 1193-204 (2007).

Como componente de ciertas realizaciones de las proteínas de la invención, el motivo señal de tipo KDEL se encuentra físicamente, orientado, o dispuesto dentro de la proteína de tal manera que está en un carboxi-terminal.

Para los fines de la presente invención, el orden o la orientación específica no es fija para la región efectora de la toxina Shiga y la región de unión en relación entre sí o del o los extremos N-terminal y C-terminal de toda la proteína (véase por ejemplo la Figura 1). En las proteínas de la presente invención, las regiones de unión y regiones efectoras de la toxina Shiga pueden estar directamente unidas entre sí y/o adecuadamente unidas entre sí a través de uno o más secuencias de polipéptidos intermedias, tales como con uno o más enlazadores conocidos en la técnica. Opcionalmente, una proteína de la presente invención puede comprender además un motivo de señal de retención/recuperación endoplásmico carboxi-terminal, tal como KDEL (SEQ ID NO: 60).

La estructura general de las proteínas de la presente invención es modular, en que varias regiones de unión diversas se pueden utilizar con la misma región efectora de la toxina Shiga desinmunizada para proporcionar diverso reconocimiento de diversas biomoléculas diana extracelular y por lo tanto que dirige la citotoxicidad, citostasis, y/o administración de material exógeno a varios tipos de células diversas. Las regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas que no son citotóxicas debido al enrutamiento subcelular inadecuada todavía pueden ser útiles para la administración de materiales exógenos en las células.

II. Uniones que conectan componentes de polipéptido de la invención y/o sus subcomponentes

Los componentes de polipéptidos y/o proteínas individuales de la invención, por ejemplo, las regiones de unión y regiones efectoras de la toxina Shiga (que pueden ser citotóxicas y/o albergar una o más mutaciones que alteran, reducen o eliminan la actividad catalítica y/o citotoxicidad), puede estar adecuadamente unidas entre sí mediante uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritas en el presente documento. Los subcomponentes de polipéptidos individuales de las regiones de unión, por ejemplo, regiones variables de cadena pesada (V_H), regiones variables de cadena ligera (V_L), regiones CDR y/o ABR, pueden estar adecuadamente unidos entre sí mediante uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento (véase, por ejemplo Weisser N, Hall J, Biotechnol Adv 27: 502-20 (2009); Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev. 65: 1357-1369 (2013)). Los componentes de la proteína de la invención, por ejemplo, regiones de unión multicadenas, pueden estar adecuadamente unidos entre sí u otros componentes del polipéptido a través de uno o más enlazadores conocidos en la técnica. Los componentes peptídicos, por ejemplo, motivos señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático de la familia KDEL, puede estar adecuadamente ligados a otro componente de la invención a través de uno o más enlazadores, tales como un enlazador proteico, que son bien conocidos en la técnica.

Los enlazadores adecuados son generalmente aquellos que permiten que cada componente de polipéptido de la invención se pliegue con una estructura tridimensional muy similar a los componentes polipeptídicos producidos individualmente sin ningún enlazador u otro componente. Los enlazadores adecuados incluyen aminoácidos individuales, péptidos, polipéptidos, y enlazadores que carecen de cualquiera de los anteriores, tales como varias cadenas de carbono no proteináceas, ya sean ramificadas o cíclicas (véase, por ejemplo Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev. 65: 1357 -69 (2013)).

Los enlazadores adecuados pueden ser proteico y comprender uno o más aminoácidos, péptidos y/o polipéptidos. Los enlazadores proteicos son adecuados para proteínas de fusión recombinantes y conjugados unidos químicamente. Un enlazador proteico tiene típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 residuos de aminoácidos, tales como, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 o de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 residuos de aminoácidos. La longitud del enlazador seleccionado dependerá de una variedad de factores, tales como,

por ejemplo, la propiedad o propiedades deseadas para las que se selecciona el enlazador (véase, por ejemplo Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev.* 65: 1357-1369 (2013)).

Los enlazadores adecuados pueden ser no proteínico, tales como, por ejemplo, enlazadores químicos (véase, por ejemplo Dosio F et al, *Toxins* 3: 848-83 (2011); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)). Se pueden usar varios enlazadores no proteínicos conocidos en la técnica para enlazar regiones de unión a las regiones efectoras de la toxina Shiga, tales como enlazadores comúnmente usados para conjugar polipéptidos derivados de inmunoglobulina a polipéptidos heterólogos. Por ejemplo, las regiones de polipéptidos pueden unirse usando las cadenas laterales funcionales de sus residuos de aminoácidos y restos de carbohidrato, tales como, por ejemplo, un grupo carboxi, amina, sulfhidrilo, ácido carboxílico, carbonilo, hidroxilo y/o anillo cíclico. Por ejemplo, se pueden usar enlaces disulfuro y enlaces tioéter para unir dos o más polipéptidos (véase, por ejemplo Fitzgerald D et al, *Bioconjugate Chem.* 1: 264-8 (1990); Pasqualucci L et al, *Haematologica* 80: 546-56 (1995)). Además, se pueden utilizar residuos de aminoácidos no naturales con otras cadenas laterales funcionales, tales como grupos cetona (véase, por ejemplo Sun S et al, *Chembiochem* 18 jul (2014); Tian F et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 1766-1771 (2014)). Los ejemplos de enlazadores químicos no proteicos incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato, S-(N-succinimidil) tioacetato (SATA), N-succinimidil-oxicarbonil-cu-metil-a-(2-piridilditio) tolueno (SMPT), N-succinimidil 4-(2-piridilditio) pentanoato (SPP), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano carboxilato (SMCC o MCC), sulfosuccinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato, 4-succinimidil-oxicarbonil- α -(2-piridilditio) tolueno, sulfosuccinimidil-6-(α -metil- α -(piridilditio)-toluamido) hexanoato, N-succinimidil-3-(2-piridilditio) -propionato (SPDP), succinimidil 6(3(-2-piridilditio)-propionamido) hexanoato, sulfosuccinimidil 6(3(-2-piridilditio) -propionamido) hexanoato, maleimidocaproil (MC), maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (MC-vc-PAB), éster N-hidroxisuccinimida de ácido 3-maleimidobenzoico (MBS), derivados de alfa alquilo, sulfoNHS-ATMBA (sulfosuccinimidil N-[3-(acetiltio)-3-metilbutiril-beta-alanina]), sulfodiclorofenol, 2-iminotiolano, 3-(2-piridilditio) -propionilhidrazida, reactivo de Ellman, ácido diclorotriazínico y S-(2-tiopiridil)-L-cisteína (véase, por ejemplo Thorpe P et al, *Eur J Biochem.* 147: 197-206 (1985); Thorpe P et al, *Cancer Res.* 47: 5924-31 (1987); Thorpe P et al, *Cancer Res.* 48: 6396-403 (1988); Grossbard M et al, *Blood* 79: 576-85 (1992); Lui C et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8618-23 (1996); Doronina S et al, *Nat Biotechnol* 21: 778-84 (2003); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)).

Los enlazadores adecuados, sean proteínicos o no proteínico, pueden incluir, por ejemplo, enlazadores sensibles a la proteasa, sensibles a potencial redox ambiente, sensible al pH, escindibles al ácido, fotoescindible y/o sensibles al calor (véase por ejemplo Dosio F et al, *Toxins* 3: 848-83 (2011); Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-1369 (2013); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)).

Los enlazadores proteicos pueden ser elegidos para la incorporación en proteínas de fusión recombinantes de la presente invención. Para las proteínas de fusión recombinantes de la invención, los enlazadores comprenden típicamente de aproximadamente 2 a 50 residuos de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 residuos de aminoácidos (Argos P, *J Mol Biol* 211: 943-58 (1990); Williamson M, *Biochem J* 297: 240-60 (1994); George R, Heringa J, *Protein Eng* 15: 871-9 (2002); Kreitman R, *AAPS J* 8: E532-51 (2006)). Comúnmente, los enlazadores proteicos comprenden una mayoría de residuos de aminoácidos con residuos polares, no cargados, y/o cargados, tales como, por ejemplo, treoninas, prolina, glutaminas, glicinas y alaninas (véase, por ejemplo Huston J et al, *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 5879-83 (1988); Pastan I et al, *Annu Rev Med.* 58: 221-37 (2007); Li J et al, *Cell Immunol.* 118: 85-99 (1989); Cumber A et al *Bioconj Chem* 3: 397-401 (1992); Friedman P et al, *Cancer Res* 53: 334-9 (1993); Whitlow M et al, *Protein Engineering* 6: 989-95 (1993); Siegall C et al, *J Immunol* 152: 2377-84 (1994); Newton et al *Biochemistry* 35: 545-53 (1996); Ladurner et al *J Mol Biol* 273: 330-7 (1997); Kreitman R et al, *Leuk Lymphoma* 52 : 82-6 (2011), US 4.894.443). Los ejemplos no limitantes de enlazadores proteicos incluyen alanina-serina-glicina-glicina-prolina-glutamato (ASGGPE) (SEQ ID NO: 89), valina-metionina (VM), alanina-metionina (AM), AM (G_{2 a}4S)_xAM (SEQ ID NO: 90) donde G es glicina, S es serina, y x es un número entero de 1 a 10 SEQ ID NO: 14).

Los enlazadores proteicos pueden ser seleccionados en base a las propiedades deseadas. Los enlazadores proteicos pueden ser elegidos por el experto en la materia con características específicas en mente, tales como para optimizar uno o más de las propiedades de plegamiento de la molécula de fusión, estabilidad, expresión, solubilidad, propiedades farmacocinéticas, propiedades farmacodinámicas, y/o la actividad de los dominios fusionados en el contexto de un constructo de fusión en comparación con la actividad del mismo dominio por sí mismo. Por ejemplo, los enlazadores proteínicos pueden seleccionarse basándose en la flexibilidad, la rigidez, y/o capacidad de escisión (véase, por ejemplo Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev.* 65: 1357-1369 (2013)). El experto en la materia puede utilizar bases de datos y herramientas de software de diseño de enlazadores para elegir enlazadores. Ciertos enlazadores se pueden elegir para optimizar la expresión (véase, por ejemplo Turner D et al, *J Immunol Methods* 205: 43-54 (1997)). Ciertos enlazadores pueden elegirse para promover las interacciones intermoleculares entre polipéptidos o proteínas idénticas para formar homomultímeros o diferentes polipéptidos o proteínas para formar heteromultímeros. Por ejemplo, los enlazadores proteínicos pueden ser seleccionados que permitan interacciones no covalentes deseadas entre los componentes de polipéptidos de proteínas de la invención, tales como, por ejemplo, interacciones relacionadas con la formación de dímeros y otros multímeros de orden superior (ver por ejemplo, US 4.946.778).

Los enlazadores proteicos flexibles son a menudo mayores que 12 residuos de aminoácidos de largo y ricos en residuos de aminoácidos no polares pequeños, residuos de aminoácidos polares, y/o residuos de aminoácidos hidrófilos, tales como, por ejemplo, glicinas, serinas y treoninas (ver por ejemplo Bird R et al, Science 242: 423-6 (1988); Friedman P et al, Cancer Res. 53: 334-9 (1993); Siegall C et al, J Immunol 152: 2377-84 (1994)). Los enlazadores proteicos flexibles pueden ser elegidos para aumentar la separación espacial entre los componentes y/o para permitir interacciones intramoleculares entre los componentes. Por ejemplo, diversos enlazadores "GS" son conocidos por el experto y se componen de múltiples glicinas y/o una o más serinas, a veces en unidades de repetición, tales como, por ejemplo, (G_xS)_n (SEQ ID NO: 115), (S_xG)_n (SEQ ID NO: 116), (GGGS)_n (SEQ ID NO: 117), y (G)_n (SEQ ID NO: 118), en la que x es de 1 a 6 y n es de 1 a 30 (véase por ejemplo WO 96/06641). Los ejemplos no limitantes de enlazadores proteicos flexibles incluyen GKSSGSGSESKE (SEQ ID NO: 119), GSTSGSGKSSEGK (SEQ ID NO: 120), GSTSGSGKSSEGSGSTKG (SEQ ID NO: 121), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 122), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 123), SRSSG (SEQ ID NO: 124), y SGSSC (SEQ ID NO: 125).

Los enlazadores proteicos rígidos son a menudo estructuras rígidas alfa-helicoidales y ricas en residuos de prolina y/o uno o más prolinas colocadas estratégicamente (ver Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev. 65: 1357-1369 (2013)). Los enlazadores rígidos pueden ser elegidos para evitar interacciones intramoleculares entre los componentes.

Los enlazadores adecuados pueden ser elegidos para permitir la separación *in vivo* de los componentes, tales como, por ejemplo, debido a la escisión y/o inestabilidad específica del entorno (ver Dosio F et al, Toxins. 3: 848-83 (2011); Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* son capaces de desunirse mediante procesamiento proteolítico y/o de reducir entornos a menudo en un sitio específico dentro de un organismo o dentro de un cierto tipo de célula (véase, por ejemplo Doronina S et al, Bioconjug Chem. 17: 144-24 (2006); Erickson H et al, Cancer Res 66: 4426-33 (2006)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* a menudo comprenden motivos sensibles a la proteasa y/o enlaces disulfuro formados por un o más pares de cisteína (véase, por ejemplo Pietersz G et al, Cancer Res 48: 4469-76 (1998); El J et al, J Immunol. Procedimientos 110: 101-9 (1998); ver Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* pueden ser diseñados para ser sensibles a las proteasas que sólo existen en ciertos lugares en un organismo, compartimentos dentro de una célula y/o se vuelven activos sólo en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas (tales como, por ejemplo, proteasas con niveles anormalmente altos, proteasas sobreexpresadas en ciertos sitios de la enfermedad, y proteasas expresadas específicamente por un microorganismo patógeno). Por ejemplo, hay enlazadores proteicos conocidos en la técnica que son escindidos por proteasas presentes solamente intracelularmente, las proteasas presentes sólo dentro de determinados tipos de células, y las proteasas presentes sólo en condiciones patológicas, como el cáncer o la inflamación, tales como, por ejemplo, motivo R-x-x-R y AMGRSGGCAGNRVGSLSGGLNLQAM (SEQ ID NO: 126).

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, puede utilizarse un enlazador que comprende uno o más sitios sensibles a proteasas para proporcionar la escisión por una proteasa presente dentro de una célula diana. En ciertas realizaciones de las proteínas de la invención, puede utilizarse un enlazador que no sea escindible para reducir la toxicidad no deseada después de la administración a un organismo vertebrado (véase, por ejemplo Polson A et al, Cancer Res. 69: 2358-64 (2009)).

Los enlazadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, enlazadores sensibles a la proteasa, sensibles a potencial redox ambiental, sensible al pH, escindible por ácido, fotoescindible, y/o sensibles al calor, ya sea proteínico o no proteínico (ver Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65.: 1357-1369 (2013)).

Los enlazadores escindibles adecuados pueden incluir enlazadores que comprenden grupos escindibles que son conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, enlazadores señalados por Zarlino D et al, J Immunol 124.: 913-20 (1980); Jung S, Moroi M, Biochem Biophys Acta 761: 152-62 (1983); Bouizar Z et al, Eur J Biochem 155.: 141-7 (1986); Parque L et al, J Biol Chem. 261: 205-10 (1986); Browning J, Ribolini A, J Immunol 143: 1859-1867 (1989); Joshi S, Burrows R, J Biol Chem 265: 14518-25 (1990).

Los enlazadores adecuados pueden incluir enlazadores sensibles al pH. Por ejemplo, ciertos enlazadores adecuados pueden ser elegidos por su inestabilidad en entornos de pH más bajos para proporcionar la disociación dentro de un compartimento subcelular de una célula diana. Por ejemplo, enlazadores que comprenden uno o más grupos tritilo, grupos tritilo derivatizados, grupos bismaleimideotxi propano, grupos de dihidrazida de ácido adípico, y/o grupos de transferrina lábiles a ácido, pueden proporcionar la liberación de componentes de las proteínas de la invención, por ejemplo un componente polipéptido, en entornos con intervalos de pH específicos (véase, por ejemplo Welhöner H et al, J Biol Chem. 266.: 4309-14 (1991); Fattom A et al, Infect Immun 60: 584-9 (1992)). Ciertos enlazadores se pueden elegir que escinden en intervalos de pH que corresponden a diferencias de pH fisiológico entre los tejidos, tales como, por ejemplo, el pH del tejido tumoral es menor que en los tejidos sanos (ver por ejemplo, US 5.612.474).

Los enlazadores fotoescindibles son enlazadores que se escinden después de la exposición a la radiación electromagnética de ciertos intervalos de longitud de onda, tales como luz en el rango visible (véase, por ejemplo Goldmacher V et al, Bioconj Chem. 3: 104-7 (1992)). Los enlazadores fotoescindibles se pueden usar para liberar un componente de una molécula de la invención, por ejemplo un componente de polipéptido, tras la exposición a la luz de determinadas longitudes de onda. Los ejemplos no limitantes de enlazadores fotoescindibles incluyen un grupo

nitrobenzilo como grupo protector fotoescindible para cisteína, reticuladores de cloruro de nitrobenzilo, copolímero de hidroxipropilmetacrilamida, copolímero de glicina, copolímero de fluoresceína y copolímero de metilrodamina (Hazum E et al., Pept Proc Eur Pept Symp. 16a, Brunfeldt K, ed, 105-110 (1981); Senter et al, Photochem Photobiol 42: 231-7 (1985); Yen et al, Makromol Chem. 190: 69-82 (1989); Goldmacher V et al, Bioconj Chem. 3: 104-7 (1992)). Los enlazadores fotoescindibles pueden tener usos particulares en la unión de componentes para formar moléculas de la invención diseñada para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones que pueden ser expuestas a la luz utilizando fibra óptica.

En ciertas realizaciones de las proteínas de la invención, una región de unión se une a una región efectora de la toxina Shiga usando cualquier número de medios conocidos para el experto, incluyendo tanto enlaces covalentes como no covalentes (véase, por ejemplo Chen X et al., Drugs Adv Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013); Behrens C, Liu B, MAbs 6: 46-53 (2014)).

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la proteína comprende una región de unión que es un scFv con un enlazador que conecta un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L). Hay numerosos enlazadores conocidos en la técnica adecuados para este propósito, tales como, por ejemplo, el péptido de 15 residuos $(Gly4Ser)_3$ (SEQ ID NO: 104). Enlazadores de scFv adecuados que pueden ser utilizados en la formación de estructuras multivalentes no covalentes incluyen GGS, GGS (Gly3Ser o G3S) (SEQ ID NO: 105), GGGGS (Gly4Ser o G4S) (SEQ ID NO: 106), GGGGSGGG (SEQ ID NO: 107), GGSGGGG (SEQ ID NO: 108), GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 109), y GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO: 110) (Plückthun A, Pack P, Immunotechnology 3: 83-105 (1997); Atwell J et al, Protein Eng. 12: 597-604 (1999); Wu A et al, Protein Eng 14: 1025-1033 (2001); Yazaki P et al, J Immunol Methods 253: 195-208 (2001); Carmichael J et al, J Mol Biol 326: 341-51 (2003); Arndt M et al, FEBS Lett 578: 257-61 (2004); Bie C et al, World J Hepatol 2: 185-91 (2010)).

Los procedimientos adecuados para la unión de los componentes de las proteínas de la presente invención pueden ser mediante cualquier procedimiento actualmente conocido en la técnica para llevarlas a cabo, siempre que la fijación no impida sustancialmente la capacidad de unión de la región de unión, la internalización celular de la proteína y/o función o funciones efectoras de la toxina deseada de la región efectora de la toxina Shiga tal como se mide mediante un ensayo apropiado, incluyendo los ensayos como se describe en el presente documento.

Para los fines de la presente invención, el orden o la orientación específica no es fija para la región efectora de la toxina Shiga y la región de unión de reconocimiento celular en relación entre sí o a toda la proteína (véase por ejemplo la Figura 1). Los componentes de los polipéptidos y proteínas de la presente invención pueden estar dispuestos en cualquier orden siempre que las actividades deseadas de la región de unión y la región efectora de la toxina Shiga no se eliminen. En las realizaciones anteriores de polipéptidos y proteínas de la presente invención, las regiones de unión, las regiones efectoras de la toxina Shiga (que pueden ser citotóxicas y/o albergar una o más mutaciones que reducen o eliminan la actividad catalítica y/o citotoxicidad), y el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico puede estar directamente unido entre sí y/o unido adecuadamente entre sí a través de una o más secuencias de polipéptidos intermedios, tales como con uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos en el presente documento.

III. Ejemplos de variaciones estructurales específicas de los polipéptidos y proteínas de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados

Para crear un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado, en principio, cualquier aminoácido en las regiones de epítipo proporcionadas puede alterarse por diversos medios, tales como, por ejemplo, delección, inserción, inversión, reestructuración, sustitución y modificación química de cadenas laterales. Sin embargo, la alteración de ciertos aminoácidos y regiones de polipéptidos usando ciertas alteraciones es más propensa a reducir con éxito la antigenicidad y/o inmunogenicidad al tiempo que conserva una función efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, los truncamientos terminales y las sustituciones de aminoácidos internos se prefieren debido a que mantienen la separación global de aminoácidos de la región efectora de la toxina efector y por lo tanto son más propensos a mantener las funciones efectoras de la toxina de Shiga.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, los polipéptidos comprenden la región efectora de la toxina Shiga de-inmunizado que comprende o que consiste esencialmente de los aminoácidos 75 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3) en el que al menos un aminoácido se altera en las regiones de epítipo de forma nativa posicionados proporcionados en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5), como se define en las reivindicaciones. Entre otras ciertas realizaciones son polipéptidos que comprenden un región efectora de la toxina Shiga desinmunizada derivado de los aminoácidos 1 a 241 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), y/SLT-2A o (SEQ ID NO: 3) en el que al menos un aminoácido se altera en las regiones de epítipo de forma nativa posicionados proporcionados en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5). Otras formas de realización son polipéptidos que comprenden un Shiga región de-inmunizado toxina efector que se derivan de los aminoácidos 1 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), y/SLT-2A o (SEQ ID NO: 3) en el que al menos un aminoácido se altera en las regiones de epítipo de forma nativa posicionados proporcionados en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5). Otras formas de realización son polipéptidos que comprenden un Shiga región de-inmunizado toxina efector que se derivan de los aminoácidos 1 a 261 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), y/SLT-2A o (SEQ ID NO: 3) en el que al menos

un aminoácido se altera en las regiones de epítipo de forma nativa posicionados proporcionados en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5).

Tal como se define en las reivindicaciones, existen numerosas sustituciones, diversas, internas de aminoácidos que se pueden utilizar para crear polipéptidos región efectora de toxina Shiga-de inmunizado de la presente invención.

De las posibles aminoácidos sustituto para utilizar dentro de una región de epítipos, los siguientes residuos de aminoácidos sustituto se predicen para ser el más probable para reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad de un epítipo - G, D, E, S, T, R, K, y H. a excepción de la glicina, estos residuos todos representan residuos polares y/o cargadas.

De los aminoácidos posibles para sustituir con los aminoácidos siguientes A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, y K se prevé que ser el más probable para reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad al tiempo que conserva una función significativa toxina Shiga efector dependiendo del aminoácido sustituido para. En general, la sustitución debe cambiar un residuo de aminoácido polar y/o cargada a un residuo no polar y no cargados. Además, puede ser beneficioso frente al Epítipo alteración para reducir el tamaño R-grupo lateral funcional de cadena del residuo total de aminoácidos y/o longitud. Por ejemplo, la alanina es generalmente una sustitución aceptable para cualquier residuo de aminoácido, y, por residuos de glicina, alanina es la opción preferida. Serina es generalmente sólo una sustitución aceptable para residuos de glutamato. Aspartato es generalmente sólo una sustitución aceptable para residuos de glutamato. La lisina es generalmente sólo una sustitución aceptable para los residuos de arginina. La glutamina es generalmente sólo una sustitución aceptable para los residuos de glutamato, lisina o arginina. La histidina es generalmente sólo una sustitución aceptable para los residuos de lisina y arginina. Sin embargo a pesar de estas generalidades de sustituciones más probables para conferir alteración epítipo, porque el objetivo es preservar la función significativa toxina Shiga efector (s), el aminoácido sustituto puede ser más probable para preservar la función de toxina Shiga efector (s) si se asemeja a la amino ácido sustituido por, tal como, por ejemplo, un no polar y/o residuo no cargado de tamaño similar sustituido por un residuo polar y/o cargada.

En base a la evidencia empírica en los Ejemplos, ciertas posiciones de aminoácidos en las subunidades A de toxinas Shiga se predicen que toleran alteraciones de epítipo, a a vez que mantienen las funciones efectoras de la toxina Shiga de forma significativa. Por ejemplo, las siguientes posiciones nativas toleraban sustituciones de aminoácidos, ya sea solos o en combinación a la vez que conservaban una función o funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como citotoxicidad - 1 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 8 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 9 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 11 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 33 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 49 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 59 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 60 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 96 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 109 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 110 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; SE 147 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 179 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 180 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 185 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 3; 248 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de la SEQ ID NO: 3; 251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 265 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

Los datos empíricos en los Ejemplos apuntan hacia otras sustituciones de alteración del epítipo y combinaciones de sustituciones que alteran el epítipo que pueden reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad, a la vez que se conserva una función efectora de la toxina Shiga significativa, tal como, por ejemplo, nuevas combinaciones de los truncamientos y posiciones antes mencionadas que toleran sustituciones, así como nuevas sustituciones en posiciones idénticas o posiciones conservadas en toxinas Shiga relacionadas.

Es previsible que otras sustituciones de aminoácidos a residuos de aminoácidos de un grupo funcional conservador puede reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad al tiempo que conserva una función significativa toxina Shiga efector. Por ejemplo, otras sustituciones conocidas para el experto que sea similar a cualquiera de K1M, T4I, S8I, T8V, T9i, S9I, K11A, K11H, S33I, S45i, T45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55V, R55L, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, T109V, G110A, S112V, G147A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R204A, R205A, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, D264A, G264A, T286A y/o T286I puede alterar mientras epítipo el mantenimiento de al menos una función efectora de la toxina Shiga. En particular, las sustituciones de aminoácidos a los residuos de aminoácidos conservativas similares a K1M, T4I, S8I, T8V, T9i, S9I, K11A, K11H, S33I, S45i, T45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55V, R55L, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I,

E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, T109V, G110A, S112V, G147A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R204A, R205A, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, D264A, G264A, T286A y/o T286I pueden tener los mismos o similares efectos. Un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga según la invención puede comprender sustituciones conservativas de aminoácidos similares, tales como, por ejemplo, K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; S8 a A, G, V, I, L, M, y M; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F, y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; S33 a A, G, V, L, I, F, y M; S45 a A, G, V, L, I, F, y M; T45 a A, G, V, L, I, F, y M; D47 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; N48 a A, G, V, L, y M; L49 a A o G; D53 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; D58 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; P59 a A, G, y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; D94 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; S96 a A, G, V, I, L, M, y M; S109 a A, G, V, I, L, M, y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F, y M; G147 a A; R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; S186 a A, G, V, I, L, M, y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; S189 a A, G, V, I, L, M, y M; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, M, y M; Y247 a A, G, V, L, I, F, y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

De manera similar, las sustituciones de aminoácidos que eliminan carga, polaridad, y/o reducir la longitud de la cadena lateral puede alterar un epítipo mientras se mantiene al menos una función efectora de la toxina Shiga. Una toxina efector polipéptido de la región Shiga de la descripción puede comprender uno o más epítopos alteradas por sustituciones de tal manera que se elimina la carga de la cadena lateral, se elimina la polaridad, y/o la longitud de la cadena lateral se reduce tal como, por ejemplo, sustituyendo el aminoácido apropiado seleccionado de el siguiente grupo a, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, o K para el residuo de aminoácido en la posición 1 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 8 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 9 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 11 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 33 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 49 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 59 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 60 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 96 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 109 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 110 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; SE 147 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 179 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 180 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 185 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de la SEQ ID NO: 3; 205 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de la SEQ ID NO: 3; 248 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de la SEQ ID NO: 3; 251 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 265 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Una toxina efector polipéptido de la región Shiga de la descripción puede comprender una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; S8 a A, G, V, I, L, M, y M; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F, y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; S33 a A, G, V, L, I, F, y M; S45 a A, G, V, L, I, F, y M; T45 a A, G, V, L, I, F, y M; D47 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; N48 a A, G, V, L, y M; L49 a A o G; D53 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; D58 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; P59 a A, G, y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; D94 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; S96 a A, G, V, I, L, M, y M; S109 a A, G, V, I, L, M, y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F, y M; G147 a A; R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; S186 a A, G, V, I, L, M, y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; S189 a A, G, V, I, L, M, y M; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, M, y M; Y247 a A, G, V, L, I, F, y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S, y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

Además, cualquier sustitución de aminoácidos en una región epítipo de un polipéptido de efectora de la toxina Shiga que altera un epítipo al tiempo que conserva la función significativa efectora de la toxina Shiga es combinable con cualquier otra sustitución de aminoácidos en la misma o una región epítipo diferente que altera un epítipo de retención función significativa toxina Shiga efector para formar un polipéptido de toxina Shiga efector de-inmunizados con múltiples regiones de epítipo alterada al tiempo que conserva un nivel significativo de la función efectora de la toxina Shiga tiempo. Un polipéptido de la región efectora toxina Shiga de la descripción puede comprender una o más de las siguientes combinaciones: K1M se puede combinar con S8I, T9i, K11A, S33I, S45i, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, G265A, y/o T286I; S8I se puede combinar con K1M, T9i, K11A, S45i, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, G265A, y/o T286I; T9i se puede combinar con K1M, S8I, K11A, S45i, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I,

R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G265A, y/o T286I; G265A se puede combinar con K1M, S8I, T9i, K11A, S45i, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, y/o T286I; y/o T286I se puede combinar con K1M, S8I, T9i, K11A, S45i, T45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, T180G, T181I, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, R204A, R205A, S247I, D264A, G264A, y/o G265A.

Sobre la base de la evidencia empírica en los Ejemplos, ciertas regiones de aminoácidos en las subunidades de toxinas Shiga se predicen para tolerar alteraciones de epítipo al tiempo que conserva las funciones significativas de toxina Shiga efectoras. Por ejemplo, las regiones de epítipo de forma nativa posicionados a 1-15, 53-66, 55-66, 94-115 y 180-190 múltiples combinaciones de sustitución de aminoácidos tolerados simultáneamente sin perder actividad de la toxina Shiga enzimática y, a menudo sin perder la citotoxicidad (véanse los Ejemplos) .

La unión de diana celular regiones de unión con polipéptidos región toxina efector de-inmunizado Shiga permite la ingeniería de células de tipo direccionamiento específico de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga con menos efectos adversos potenciales resultantes de la antigenicidad y/o inmunogenicidad cuando se administra a una mamífero, por ejemplo, un sujeto humano. Las proteínas de la presente invención comprenden de-inmunizaron Shiga regiones toxina efectoras derivadas de las subunidades de los miembros de la familia de toxinas Shiga como se define en las reivindicaciones vinculadas a las regiones de unión que pueden unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular en asociación física con una célula , tal como una biomolécula diana expresada en la superficie de una célula. Esta estructura general es modular en que cualquier número de diversas regiones de unión dirigidas a células puede estar relacionada con los polipéptidos de la región efectora toxina Shiga de-inmunizado de la presente invención.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, las proteínas comprenden una región de unión derivado de un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado por específico y la unión a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde se restringe el antígeno de alta afinidad en la expresión a las células cancerosas (véase Glökler J et al, las moléculas. 15: 2478-90 (2010); Liu Y et al, Lab chip de 9:.. 1033-6 (2009) según otras realizaciones, la región de unión es seleccionados para específico y de alta afinidad de unión a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde el antígeno es sobre-expresado o preferencialmente expresado por las células cancerosas en comparación con células no cancerosas. Algunas biomoléculas diana representativos incluyen, pero son no limitado a, los siguientes objetivos enumerados asociados con cánceres y/o tipos de células inmunes específicos.

Existen muchos regiones de unión de tipo inmunoglobulina que reconocen epítopos asociados con células cancerosas en la técnica anterior, tales como regiones de unión que se dirigen a la anexina A1, antígeno B3 melanoma, antígeno B4 melanoma, CD2, CD3, CD4, CD20 (B-linfocitos proteína del antígeno CD20), CD22, CD25 (interleucina-2 IL2R receptor), CD30 (TNFRSF8), CD38 (cíclico ADP ribosa hidrolasa), CD40, CD44 (receptor de hialuronano), ITGAV (CD51), CD66, CD71 (receptor de transferrina), CD73, CD74 (HLA-DR antígenos asociados a la cadena invariante), CD79, CD98, endogлина (END, CD105), CD106 (VCAM-1), el tipo de receptor de quimioquinas 4 (CDCR-4, fusin, CD184), CD200, insulina factor de crecimiento 1 receptor (CD221), mucin1 (MUC1, CD227), basal molécula de adhesión celular (B-CAM, CD239), CD248 (endosialina, TEM1), tumor necrosis 10b receptor del factor (TNFRSF10B, CD262), receptor del factor de necrosis tumoral 13B (TNFRSF13B, TACI, CD276), vascular receptor del factor de crecimiento endotelial 2 (KDR, CD309), epiteliales molécula de adhesión celular (EpCAM, CD326), epidérmico humano crecerá factor de ⁰ receptor 2 (HER2, Neu, ErbB2, CD340), antígeno de cáncer 15-3 (CA15-3), antígeno de cáncer 19-9 (CA 19-9), antígeno de cáncer 125 (CA125, MUC16), CA242, antígeno carcinoembrionario moléculas de adhesión celular relacionados con la PI (por ejemplo CEACAM3 (CD66d) y CEACAM5), proteína del antígeno carcinoembrionario (CEA), sulfato de condroitina proteoglicano 4 (CSP4, MCSP, NG2), CTLA4, DLL4, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, ErbB1), receptor de folato (FOLR), G-28, gangliósido GD2, gangliósido GD3, HLA-DR10, HLA-DRB, factor de crecimiento epidérmico humano receptor 1 (HER1), Efrina tipo-B receptor 2 (EphB2), epiteliales molécula de adhesión celular (EpCAM), proteína de fibroblastos de activación (FAP/seprasa), factor de crecimiento similar a la insulina 1 receptor (IGF1R), interleuquina 2 receptor (IL-2R), interleuquina 6 receptor (IL-6R), integrinas alfa-V beta-3 ($\alpha_v \beta_3$), integrinas beta-5 alfa-V (? v? 5), integrinas alfa-5 beta-1 ($\alpha_5 \beta_1$), L6, MPG, antígeno asociado a melanoma 1 proteína (MAGE-1), antígeno 3 asociado a melanoma (MAGE -3), mesotelina (MSLN), MPG, MS4A , P21, p97, receptor 4 similar (PVRL4), activados por proteasa-receptores (tales como PARI), proteína de antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), trofoblasto glicoproteína (TPGB), y transductores de señal de calcio asociados a tumores (virus de la polio TACSTDs) (véase, por ejemplo Lui B et al, Cancer Res. 64: 704-10 (2004); . Novellino L et al, Cancer Immunol Immunother 54: 187-207 (2005); Bagley R et al, Int J Oncol 34:.. 619-27 (2009); Gerber H et al, mAbs 1: 247-53 (2009);. Beck A et al, Nat Rev Immunol. 10: 345-52 (2010); Andersen J et al, J Biol Chem 287:.. 22927-37 (2012); . Nolan-Stevaux O et al, PLoS One 7: e50920 (2012); . Rust S et al, Cancer Mol 12: 11 (2013)). Esta lista de biomoléculas diana está destinado a ser no limitativo. Se apreciará por el experto en la materia que cualquier biomolécula diana deseada asociado con una célula de cáncer o de otro tipo de célula deseado se puede usar para diseñar o seleccionar una región de unión para ser acoplado con la región efectora de la toxina Shiga para producir una proteína de la presente invención.

Los ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con células de cáncer y han regiones de unión de tipo inmunoglobulina sabe que se unen ellos incluyen proteínas BAGE (antígenos B de melanoma), moléculas de adhesión celular basales (BCAMs o Lutheran glicoproteínas de grupos sanguíneos), tumor de vejiga antígeno (BTA), antígeno de cáncer de testículo-NY-ESO-1, las proteínas LAGE antígeno de cáncer de testículo, CD19 (proteína de antígeno de linfocitos B CD19), CD21 (receptor del complemento-2 o complemento receptor 3d), CD26 (dipeptidil peptidasa-4 , DPP4, o adenosina desaminasa complejante proteína 2), CD33 (de tipo inmunoglobulina lectina-3), CD52 (CAMPATH-1 antígeno), CD56, CS1 (número de familia SLAM 7 o SLAMF7), de la superficie celular de proteína A33 antígeno de unión a ácido siálico (gpA33), Epstein-Barr proteínas de antígeno virus, proteínas GAGE/PAGE (antígenos melanoma asociado de cáncer/testículo), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR o c-Met), proteínas MAGE, antígeno de melanoma reconocido por células T 1 de proteínas (MART -1/MelanA, MARTI), mucinas, expresados preferencialmente Antígeno de melanoma (PRAME) proteínas, la proteína de antígeno específico de próstata (PSA), próstata proteína de antígeno de células madre (PSCA), receptor para la glucosilación avanzada Endroducts (RAGE), glicoproteína asociada a tumor 72 (TAG-72), receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR), y el antígeno de tumor de Wilms.

Los ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con las células cancerosas son anhidrasa carbónica IX (CA9/CAIX), claudin proteínas (CLDN3, CLDN4), tipo-A ephrin receptor 3 (EphA3), proteínas de unión a folato (FBP), gangliósido GM2, receptores de factores de crecimiento similares a la insulina, integrinas (como CD11a-c), receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK), receptor tirosina-proteína cinasa erb-3, necrosis 10A receptor del factor tumoral (TRAIL-R1/DR4), receptor del factor de necrosis tumoral 10B (TRAIL-R2), tenascina C, y CD64 (Fc? RI) (véase Hough C et al, Cancer Res 60: 6281-7 (2000.); Thepen T et al, Nat Biotechnol. 18: 48-51 (2000); Pastan I et al, Cancer Nat Rev 6: 559-65 (2006); Pastan, Annu Rev Med 58:.. 221-37 (2007); Fitzgerald D et al, Cancer Res 71: 6300 . -9 (2011); Scott A et al, Cancer Immun 12: 14-22 (2012)). Esta lista de biomoléculas diana está destinado a ser no limitativo.

Además, existen numerosos otros ejemplos de contempladas, biomoléculas diana tales como las metaloproteinasas de ADAM (por ejemplo, ADAM-9, ADAM-10, ADAM-12, ADAM-15, ADAM-17), ADP-ribosiltransferasas (ART1, ART4), antígeno F4/80, los antígenos de estroma de médula ósea (BST1, BST2), la rotura (BCR-aBL) proteínas región-c-abl oncogén racimo punto, C3aR (receptores del complemento componente 3a), CD7, CD13, CD14, CD15 (Lewis X o etapa específica de antígeno embrionario 1), CD23 (FC epsilon RII), CD49d, CD53, CD54 (molécula de adhesión intercelular 1), CD63 (tetraspanin), CD69, CD80, CD86, CD88 (complemento componente 5a receptor 1), CD115 (estimulante de colonias de receptor del factor 1), CD123 (interleucina-3 receptor), CD129 (interleucina 9 receptor), CD183 (receptor de quimiocinas CXCR3), CD191 (CCR1), CD193 (CCR3), CD195 (receptor de quimiocina CCR5), CD203c, CD225 (transmembrana de proteína inducida por interferón 1), CD244 (Natural Killer Cell receptor 2B4), CD282 (receptor Toll-like 2), CD284 (receptor Toll-like 4), CD294 (GPR44), CD305 (leukocyte- asociado receptor similar a inmunoglobulina 1), tipo-A ephrin receptor 2 (EphA2), FcεR1a, galectina-9, antígeno alfa-fetoproteína proteína 17-A1, aspartil humana (asparaginil) beta-hidroxilasa (HAAH), similar a una inmunoglobulina ILT transcripción -3, lysophosphatidglycerol aciltransferasa 1 (LPGAT1/IAA0205), lisosoma asociada a proteínas de membrana (lámparas, tales como CD107), proteínas de melanocitos PMEL (gp100), proteína-14 (MRP-14) relacionado mieloid-, receptor tirosina-cinasa erbB de proteínas -3, proteínas SART, receptores scavenger (tales como CD64 y CD68), Siglecs (de tipo inmunoglobulina lectinas de unión a ácido siálico), syndecans (tales como SDC1 o CD138), tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa-1 (TRP-1), proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP-2), tirosinasa antígeno asociado (TAA), APO-3, BCMA, CD2, CD3, CD4, CD8, CD18, CD27, CD28, CD29, CD41, CD49, CD90, CD95 (Fas), CD103, CD104, CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA-4), los receptores de quimiocinas, proteínas del complemento, receptores de citoquinas, proteínas de histocompatibilidad, ICOS, interferón-alfa, interferón-beta, c-myc, osteoprotegerina, PD-1, RANK, TACI, TNF miembro de la superfamilia del receptor (TNF-R1, TNFR-2), Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, y TRAIL -R4 (véase Scott A et al, Inmunidad cáncer 12: 14 (2012); . Cheever M et al, Clin Cancer Res 15: 5323-37 (2009)), para biomoléculas diana y tenga en cuenta las moléculas diana descritas en la misma son ejemplos no limitantes). Se apreciará por el experto en la materia que cualquier biomolécula diana deseada se puede usar para diseñar o seleccionar una región de unión para ser acoplado con una región toxina efector de-inmunizado Shiga para producir una proteína de la presente invención.

En ciertas realizaciones, la región de unión comprende o consiste esencialmente de un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado por específico y la unión a la superficie celular de un tipo de célula del sistema inmune de alta afinidad. Por ejemplo, dominios de unión de tipo inmunoglobulina son conocidos que se unen a CD1, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD9, CD10, CD11, CD12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD40, CD41, CD56, CD61, CD62, CD66, CD95, CD117, CD123, CD235, CD146, CD326, receptor de interleucina 2 (IL-2R), el receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL), SLAM-proteína asociada (SAP), y el ligando del factor TNFSF18 (necrosis tumoral 18 o GITRL).

Para ciertas realizaciones, la proteína de-inmunizado citotóxico comprende o consiste esencialmente de aminoácidos de SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, o SEQ ID NO: 56. Estas realizaciones proteína citotóxica de unión a CD20-inmunizado de-se pueden usar para tratar y/o cáncer de hueso diagnóstico, leucemia, linfoma, melanoma, mieloma, la amiloidosis, la espondilitis anquilosante, asma, enfermedad, diabetes, rechazo de injerto de Crohn, de injerto contra huésped- la enfermedad, la tiroiditis de Hashimoto, síndrome hemolítico urémico, las

enfermedades relacionadas con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, y/o vasculitis.

5 Para ciertas realizaciones, la proteína de-inmunizado citotóxico comprende o consiste esencialmente de aminoácidos de SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, o SEQ ID NO: 59. Estos DE-inmunizaron HER-2 de unión a realizaciones proteína citotóxica se puede usar para tratar y/o diagnóstico de cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de cabeza-cuello (por ejemplo, orofaringe), cáncer gastrointestinal (por ejemplo, de esófago y colorrectal), del tracto renal-urinario cáncer (por ejemplo la vejiga), pulmón/cáncer de pleura, y cáncer de ovario.

10 En ciertas realizaciones, la región de unión comprende o consiste esencialmente en un ligando seleccionado para dirigir un receptor extracelular. Algunos ligandos representativos incluyen, pero no se limitan a, las siguientes proteínas morfogénicas óseas y activina inhibidor unido a la membrana BAMBI (también conocido como TGFBR), CD137L (también conocido como 41BB), receptor señuelo 3 DcR3 (también conocido como TR6 y TNFRSF6B), y el factor de necrosis tumoral TWEAK (también conocido como TNFSF12 y APO3L). Para ligandos ejemplares más no limitativos, consulte la Tabla 12 en los Ejemplos.

15 De inmunizados toxina Shiga regiones efectoras que se convierten en no tóxico después de la alteración de epítomos, por ejemplo, toxina Shiga regiones efectoras que comprenden R179A, todavía puede ser útil para la entrega de materiales exógenos en las células. Inmunizados-De regiones toxina Shiga efectoras que retienen solamente un nivel significativo de la función de la toxina Shiga de la actividad catalítica son todavía útiles como componentes enzimáticamente activas, DE-inmunizado de moléculas.

20 Está dentro del alcance de la descripción de usar fragmentos, variantes, y/o derivados de los polipéptidos y proteínas de la presente invención que contienen el sitio de unión una biomolécula diana extracelular funcional, e incluso más preferiblemente capaz de unirse a la biomolécula diana con de alta afinidad (por ejemplo, como se muestra por K_D). Por ejemplo, cualquier región de unión que comprende un polipéptido que se une a una biomolécula diana, expresada preferentemente en una superficie celular, con una constante de disociación de 10^{-5} a 10^{-12} moles por litro, preferiblemente menos de 200 nM, puede estar sustituido para uso en la fabricación de moléculas de la presente invención (polipéptidos inmunizados de-por ejemplo, la toxina Shiga efectoras y proteínas citotóxicas) y los procedimientos de la presente invención.

IV. Funciones generales de los polipéptidos y proteínas de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados

35 Los polipéptidos y proteínas de la presente invención han mejorado utilidad para la administración a especies de mamíferos, ya sea como un agente de diagnóstico terapéutico y/o debido a la reducción de la probabilidad de producir respuestas inmunes no deseadas en los mamíferos. Es importante destacar que, en los polipéptidos de la presente invención, las funciones biológicas deseadas de las regiones originales toxina Shiga efectoras se conservaron después de que se altera el epítomo (s) de células B. Además, los epítomos de células B a menudo coinciden o se solapan con epítomos de células T CD4 + maduras, por lo tanto la alteración de un epítomo de células B a menudo altera simultáneamente un epítomo de células T CD4 +.

40 Los diversos polipéptido efectores de toxina Shiga desinmunizados de la presente invención pueden diferir en sus perfiles de antigenicidad cuando se administra a varios mamíferos, pero se espera que tengan reducida antigenicidad y/o inmunogenicidad. No es necesario eliminar completamente toda la inmunogenicidad de un polipéptido derivado de la toxina Shiga con el fin de mejorar su uso en aplicaciones médicas que implican la administración a un mamífero (ver Nagata, Adv Drug Deliv Rev 61: 977-85 (2009)). La modificación de sólo unos pocos aminoácidos dominantes en una proteína terapéutica puede reducir en gran medida su antigenicidad y/o inmunogenicidad sin perturbar de la proteína total estabilidad, estructura y función. Sin embargo, se espera que las regiones de polipéptidos de la toxina Shiga efector con alteraciones en epítomos de células B más inmunogénicas a ser más ventajoso para la administración a mamíferos cuando es deseable para evitar la no deseada de células B y/o de células T respuestas inmunes CD4 +.

45 La presente invención proporciona diversos polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados tal como se definen en las reivindicaciones, que pueden ser utilizados como componentes de varias composiciones de la materia, tales como proteínas citotóxicas dirigida por células y composiciones de diagnóstico. En particular, los polipéptidos de la toxina efectoras de-inmunizado Shiga tienen usos como componentes de diferentes proteínas terapéuticas, tales como, por ejemplo, inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina, para la matanza selectiva de tipos específicos de células para el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo cánceres, trastornos del sistema inmune, y las infecciones microbianas.

50 La presente invención también proporciona diversas proteínas citotóxicas que comprenden regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas, tal como se define en las reivindicaciones funcionalmente asociados con regiones de unión para efectuar la diana celular de tal manera que las proteínas citotóxicas matan selectivamente, inhibir el crecimiento de, entregar material exógeno a y/o detectar tipos celulares específicos. Las regiones de unión de las proteínas de la presente invención son capaces de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular en asociación física con una célula, tal como una biomolécula diana expresa en la superficie de una célula. El enlace de célula de orientación regiones de unión con polipéptidos región toxina efector de-inmunizado Shiga

permite la ingeniería de células de tipo direccionamiento específico de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga y/o citostasis.

5 En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención son capaces de unirse biomoléculas diana extracelulares asociados a la superficie celular de tipos de células particulares y entrando en esas células. Una vez interiorizado dentro de un tipo de célula específica, ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención son capaces de encaminar un enzimáticamente activa, citotóxica, fragmento de polipéptido de la toxina Shiga efector en el citosol de la célula diana. Una vez en el citosol de un tipo de célula específica, ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la presente invención son capaces de inactivar los ribosomas enzimáticamente y finalmente matar a la
10 célula. Alternativamente, las variantes no tóxicas de las proteínas de la presente invención pueden usarse para suministrar materiales exógenos adicionales en las células diana, tales como péptidos, polipéptidos, proteínas, polinucleótidos, y agentes de detección promoción. Este sistema es modular, en que cualquier número de diversas regiones de unión se puede utilizar para dirigirse a esta potente citotoxicidad para varios tipos diversos, teléfonos.

15 A. Eliminación celular a través de citotoxicidad de la toxina Shiga dirigida

Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para matar las células eucariotas, proteínas citotóxicas diseñados usando regiones efectoras de la toxina Shiga des inmunizadas puede mostrar actividad de
20 eliminación celular potente. Las subunidades de los miembros de la familia de toxinas Shiga comprenden dominios enzimáticas capaces de matar a una célula eucariota, una vez en el citosol de la célula. La alteración de epítopos de células B no alteró significativamente el mecanismo citotóxico de ciertas regiones de la toxina Shiga efectoras de la presente invención. Por lo tanto, las proteínas citotóxicas de-inmunizado de la presente invención mantienen potente citotoxicidad al tiempo que reduce la probabilidad de que ciertas respuestas inmunes cuando se administra a un mamífero.

25 En ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de-inmunizado de la presente invención, al entrar en contacto una célula acoplado físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de una proteína citotóxica de la presente invención (diana + célula), la proteína citotóxica es capaz de causando la muerte de la célula. La muerte de células se puede realizar usando una proteína citotóxica de la presente invención bajo condiciones variadas de las células diana, tales como un manipulado célula diana ex vivo, una célula diana se cultivan in vitro, una célula diana dentro de una muestra de tejido cultivado in vitro, o una célula diana en vivo.

B. Citotoxicidad selectiva entre los tipos celulares

35 Al dirigirse a la entrega de, inmunizados de-, regiones enzimáticamente activas de toxina Shiga utilizando regiones a tipos celulares específicos de unión de alta afinidad, esta actividad de las células-kill potente se puede restringir a matar preferentemente tipos de células seleccionadas.

40 En ciertas realizaciones, tras la administración de la proteína de la presente invención a una mezcla de tipos de células, la proteína es capaz de matar selectivamente las células que se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular en comparación con los tipos de células no acopladas físicamente con un extracelular apuntar biomolécula. Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para matar las células eucariotas, las proteínas citotóxicas diseñados utilizando regiones efectoras de toxina Shiga pueden mostrar actividad citotóxica potente. Al dirigirse a la entrega de enzimáticamente activas regiones de toxina Shiga a tipos de células
45 específicos utilizando regiones de unión de alta afinidad, esta actividad de muerte celular potente puede restringirse a matar sólo aquellos tipos de células deseadas a ser el blanco de su asociación física con una biomolécula diana de los elegidos regiones de unión.

50 En ciertas realizaciones, la proteína citotóxica de la presente invención es capaz de causar selectivamente o preferencialmente la muerte de un tipo celular específico dentro de una mezcla de dos o más tipos diferentes de células. Esto permite que la actividad citotóxica dirigida a determinados tipos de células con una alta preferencialidad, tales como un efecto citotóxico de 3 veces, más tipos de células "espectador" que no expresan la biomolécula diana. Alternativamente, la expresión de la biomolécula diana de la región de unión puede ser no exclusiva para un tipo de célula si la biomolécula diana se expresa en suficientes cantidades bajas y/o se acopla físicamente en
55 cantidades bajas con tipos de células que no son para ser dirigido. Esto permite a la célula-asesinato selectivo de tipos de células específicas con una alta preferencialidad, tales como un efecto citotóxico de 3 veces, más tipos de células "espectador" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana o no se acoplan físicamente a cantidades significativas de la biomolécula diana.

60 En ciertas realizaciones adicionales, tras la administración de la proteína citotóxica para dos poblaciones diferentes de tipos de células, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte celular tal como se define por la concentración media máxima citotóxico (CD_{50}) en una población de células diana, cuyos miembros expresan una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína citotóxica, a una dosis por lo menos tres veces menor que el CD_{50} dosis de la misma proteína citotóxica para una población de células cuyos miembros no expresan una
65 biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína citotóxica.

En ciertas realizaciones, la actividad citotóxica hacia las poblaciones de tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular es al menos 3 veces mayor que la actividad citotóxica hacia las poblaciones de tipos de células no acopladas físicamente con cualquier biomolécula diana extracelular de la región de unión. Según la presente invención, la citotoxicidad selectiva puede ser cuantificada en términos de la relación (a/b) de (a) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo celular específico acoplado físicamente con una biomolécula diana de la región de unión a (b) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo de célula no acoplado físicamente con una biomolécula diana de la región de unión. En ciertas realizaciones, la relación de la citotoxicidad es indicativa de la citotoxicidad selectiva que es al menos 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50- veces, 75 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces, 750 veces, o 1.000 veces mayor para las poblaciones de células o tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión en comparación con las poblaciones de células o tipos de células no acoplados físicamente con una biomolécula diana de la región de unión.

Esta función de destrucción celular preferencial permite a una célula diana a eliminar por ciertas proteínas citotóxicas de la presente invención bajo condiciones variadas y en la presencia de células que no son objeto de espectador, como ex vivo mezclas manipuladas de tipos de células, in vitro cultivaron tejidos con mezclas de tipos de células, o in vivo en la presencia de múltiples tipos de células (por ejemplo, in situ o en una ubicación nativa dentro de un organismo multicelular).

C. Suministro de material exógeno adicional en el interior de las células diana

Además de las aplicaciones citotóxicos y citostáticos, proteínas de la presente invención opcionalmente pueden ser utilizados para la recopilación de información y funciones de diagnóstico. Además, las variantes no tóxicas de las proteínas citotóxicas de la presente invención, o variantes opcionalmente tóxicas, puede ser utilizado para entregar materiales exógenos adicionales y/o etiquetar los interiores de las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la proteína citotóxica. Varios tipos de células y/o poblaciones de células que expresan biomoléculas diana a al menos una superficie celular pueden ser dirigidos por las proteínas de la presente invención para la recepción de materiales exógenos. Los componentes funcionales de la presente invención son modulares, en que las diversas regiones de la toxina Shiga efectoras y materiales exógenos adicionales pueden estar relacionadas con diferentes regiones de unión para proporcionar diversas aplicaciones, tales como no invasiva de imágenes in vivo de las células tumorales.

Debido a que las proteínas de la presente invención, incluyendo formas no tóxicas de los mismos, son capaces de entrar en las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular reconocido por región de unión de la proteína, ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención pueden usarse para suministrar materiales exógenos adicionales en el interior de tipos de células específicas. En un sentido, toda la proteína de la presente invención es un material exógeno que entrar en la célula; Por lo tanto, los materiales exógenos "adicionales" son materiales heterólogos ligados a pero aparte de la propia proteína citotóxica núcleo. De-inmunizado regiones toxina Shiga efectoras que se convierten en no tóxico después de la alteración de epítipo todavía pueden ser útiles para la entrega de materiales exógenos en células (por ejemplo R179A).

"Material exógeno adicional" tal como se utiliza aquí se refiere a una o más moléculas, a menudo no presente generalmente dentro de una célula diana nativo, en donde las proteínas de la presente invención pueden utilizarse para transportar específicamente dicho material al interior de una célula. Los ejemplos no limitativos de materiales exógenos adicionales son péptidos, polipéptidos, proteínas, polinucleótidos, pequeños agentes quimioterapéuticos molécula, y agentes de detección promoción.

En ciertas realizaciones, el material exógeno adicional comprende una proteína o polipéptido que comprende una enzima. En ciertas otras realizaciones, el material exógeno adicional es un ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un ácido ribonucleico que funciona como un pequeño ARN inhibidora (siRNA) o microRNA (miRNA). En ciertas realizaciones, el material exógeno adicional es un antígeno, tal como antígenos derivados de proteínas bacterianas, proteínas virales, proteínas mutadas en el cáncer, proteínas aberrantemente expresadas en el cáncer, o regiones determinantes de células T complementarias. Por ejemplo, materiales exógenos incluyen antígenos, como los característicos de las células presentadoras de antígeno infectadas por bacterias, y de células T complementaria regiones determinantes capaces de funcionar como antígenos exógenos. Ejemplos adicionales de materiales exógenos incluyen polipéptidos y proteínas más grandes que un péptido antigénico, tales como enzimas. Materiales exógenos que comprenden polipéptidos o proteínas pueden comprender opcionalmente uno o más antígenos conocidos o desconocidos para el experto.

D. Recopilación de información para funciones de diagnóstico

Ciertas proteínas de la presente invención tienen usos en la in vitro y/o la detección in vivo de células específicos, tipos de células, y/o poblaciones de células en. En ciertas realizaciones, las proteínas descritas en el presente documento se utilizan tanto para el diagnóstico y el tratamiento, o para el diagnóstico solo. Cuando se usa la misma proteína citotóxica tanto para el diagnóstico y el tratamiento, la variante de proteína citotóxica que incorpora una detección agente promotor para el diagnóstico puede volverse no tóxico por la inactivación catalítica de una región

efectora toxina Shiga través de una o más sustituciones de aminoácidos, incluyendo sustituciones ejemplares descritos Aquí en. Formas no tóxicas de las proteínas citotóxicas de la presente invención que se conjugan a la detección agentes promotores opcionalmente pueden usarse para funciones de diagnóstico, tales como para el diagnóstico de compañía utilizados en conjunción con un régimen terapéutico que comprende la misma o una región de unión relacionados.

La capacidad para conjugar agentes de detección promover conocidos en la técnica para diversas proteínas de la presente invención proporciona composiciones útiles para la detección de cáncer, tumor, inmune, y las células infectadas. Estas formas de realización de diagnóstico de las proteínas de la presente invención pueden ser utilizados para la recopilación de información a través de diversas técnicas de imagen y ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las realizaciones de diagnóstico de las proteínas de la presente invención pueden ser utilizados para la recopilación de información a través de imágenes de los orgánulos intracelulares (por ejemplo endocítica, Golgi, retículo endoplásmico, y los compartimentos citosólicos) de células individuales de cáncer, células inmunes, o células infectadas en un paciente o muestra de biopsia.

Varios tipos de información pueden ser recogidos utilizando las realizaciones de diagnóstico de las proteínas de la presente invención tanto para usos de diagnóstico u otros usos. Esta información puede ser útil, por ejemplo, en el diagnóstico de los tipos de células neoplásicas, la determinación de susceptibilidades terapéuticos de la enfermedad de un paciente, el ensayo de la progresión de terapias antineoplásicas con el tiempo, el ensayo de la progresión de las terapias inmunomoduladoras con el tiempo, el ensayo de la progresión de las terapias antimicrobianas con el tiempo, evaluar la presencia de células infectadas en los materiales de trasplante, la evaluación de la presencia de tipos celulares no deseados en los materiales de trasplante, y/o evaluar la presencia de células tumorales residuales después de la extirpación quirúrgica de una masa tumoral.

Por ejemplo, subpoblaciones de pacientes podrían ser determinados utilizando información obtenida usando las variantes de diagnóstico de las proteínas de la presente invención y, a continuación pacientes individuales podría clasificarse en subpoblaciones en base a su única característica (s) reveló usando aquellas formas de realización de diagnóstico. Por ejemplo, la eficacia de productos farmacéuticos o terapias específicas podría ser un tipo de criterio usado para definir una subpoblación de pacientes. Por ejemplo, una variante de diagnóstico no tóxico de una proteína citotóxica particular de la presente invención puede ser utilizada para diferenciar qué pacientes están en una clase o subpoblación de pacientes predijo para responder positivamente a una variante citotóxica de la misma proteína de la presente invención. En consecuencia, los procedimientos asociados para la identificación del paciente, la estratificación del paciente, y el diagnóstico utilizando proteínas-de inmunizado de la presente invención, incluyendo variantes no tóxicas de proteínas citotóxicas de la presente invención, se consideran dentro del alcance de la presente descripción.

E. Materiales de inmunización/vacunación y antitoxinas

Los polipéptidos de la presente invención tienen usos como la inmunización sesgada y/o materiales de vacunación para la conducción de la elicitación de la respuesta inmunitaria a epítopos específicos en presencia de un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de-inmunizado de la presente invención. Las infecciones por microorganismos Shiga productoras de toxinas son responsables de la morbilidad y la mortalidad (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). toxina Shiga producir bacterias son la causa principal del síndrome urémico hemolítico (SUH) y Shigelosis, así como las condiciones asociadas tales como la colitis hemorrágica y la diarrea (ver Karmali M, Mol Biotechnol 26: 117-22 (2004)). Además, las toxinas Shiga se clasifican por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) como agentes de Categoría B biothreat por su potencial para ser utilizado como un arma biológica.

Los anticuerpos de mamíferos provocadas durante la respuesta inmunitaria a una holotoxina Shiga o Shiga subunidad toxina pueden ser o bien neutralizante o no neutralizante en función del epítipo. Además, los anticuerpos que reconocen las toxinas Shiga pueden tener diferentes efectos de neutralización en función de la subunidad de la toxina Shiga comprende el epítipo del anticuerpo (Krautz-Peterson G et al, Infect Immun. 76: 1931-9 (2008)). Ciertos polipéptidos de la presente invención son por tanto útiles en procedimientos para aumentar artificialmente respuestas inmunes de mamíferos lejos de ciertas regiones de epítipo, tales como, por ejemplo, que provocan anticuerpos no neutralizantes indeseables y hacia otros epítopos, tales como, por ejemplo, que provocan neutralizante deseable y/o anticuerpos protectores.

Ciertos polipéptidos de la presente invención tienen usos como la inmunización sesgada y/o materiales de vacunación en procedimientos para reducir y/o eliminar la antigenicidad y/o inmunogenicidad de epítopos específicos permitiendo al mismo tiempo la elicitación de la respuesta inmunitaria a los epítopos no desorganizada, nativo. Técnicas de inmunización para los mamíferos se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-toxina Shiga que están sesgados lejos de una región (s) epítipo seleccionado de una toxina Shiga A Subunidad.

Además, ciertos polipéptidos de la presente invención pueden usarse en diversos procedimientos de cribado, tal como, por ejemplo, el cribado de visualización de proteínas y en las selecciones in vitro, para la generación, identificación y maduración de la afinidad de los diversos dominios de unión, tal como, por ejemplo, dominios de tipo inmunoglobulina, que se unen toxinas Shiga tal que selecciones de pantalla están sesgadas lejos de una región epítipo seleccionado

(s) de una toxina Shiga a subunidad (ver Glökler J et al, las moléculas. 15: 2478-90 (2010); Bradbury a et al, Nat Biotechnol 29: 245-54 (2011); Chen T, Keating A, Protein Sci. 21.: 949-63 (2012); Geyer C et al, Methods Mol Biol 901: 11-32 (2012)). Estos procedimientos son particularmente útiles para la orientación epítomos discontinuos que no se pueden orientar en ausencia de otros epítomos no orientados. Estos procedimientos se utilizan para generar nuevos anticuerpos neutralizantes y dominios de tipo no de inmunoglobulina que inhiben la toxicidad de la toxina Shiga (ver Perera L et al, J Clin Microbiol 26: 2127-31 (1988); Mukherjee J et al, Infect Immun 70...: 5896-9 (2002); Smith M et al, Infect Immun 77: 2730-40 (2009); Rocha L et al, toxinas 4:... 729-47 (2012); Tremblay J et al, Infect Immun 81.: 4592-603 (2013); Skinner C et al, PLoS One. 9: e99854 (2014)).

Ciertos polipéptidos de la presente invención se pueden usar como materiales de inmunización en procedimientos para la creación y/o producción de anticuerpos anti-toxina Shiga sesgado o anti-toxinas. Técnicas de inmunización para los mamíferos se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-toxina Shiga que están sesgados lejos de una región (s) epítomo seleccionado de una toxina Shiga A Subunidad. Por ejemplo, ciertos polipéptidos de la presente invención se pueden usar como un material de inmunización para generar anti-toxina Shiga A anticuerpos de subunidades que están sesgados lejos de una región (s) epítomo seleccionado de una toxina Shiga A Subunidad. Además, mediante la combinación de una toxina Shiga de-inmunizado subunidad A de la presente invención con la toxina Shiga subunidades B, técnicas de inmunización se pueden usar para generar anticuerpos de la toxina anti-Shiga sesgado hacia epítomos presentes sobre la toxina Shiga nativo subunidades B y/o interfaces entre el subunidades de la toxina Shiga presentes en la holotoxina. Estos anticuerpos anti-toxina Shiga tienen usos en procedimientos que implican ensayos de inmuno-detección y para la creación de la toxina Shiga anticuerpos neutralizantes o antitoxinas (ver Mukherjee J et al, Infect Immun. 70: 5896-9 (2002); Sheoran A et al., Infect Immun 71: 3125-30 (2003); Cheng L et al, toxinas. 5: 1845-1858 (2013); Él X et al, J Immunol Methods 389.: 18-28 (2013); Tremblay J et al., Infect Immun 81: 4592-603 (2013)). Por lo tanto, ciertos polipéptidos de la presente invención pueden ser utilizados para generar mejor toxina Shiga anticuerpos neutralizantes que luego se pueden administrar como un agente protector, agente terapéutico, o por ingeniería genética en un protector y/o terapéutico para el tratamiento de infecciones por toxina Shiga microorganismos productores o otras exposiciones a toxinas Shiga (véase Fujii J et al, Microb Pathog. 25: 139-46 (1998); Mukherjee J et al, Infect Immun 70...: 5896-9 (2002); Sheoran a et al, Infect Immun 71 : 3125-30 (2003); Gao X et al, Vaccine 29: 6656-63 (2011); Cheng L et al, toxinas 5:... 1845-1858 (2013); HE x y otros, J Immunol Methods 389 : 18-28 (2013); Tremblay J et al, Infect Immun 81...: 4592-603 (2013); Vance D et al, J Biol Chem 288: 36538-47 (2013)).

Ciertos polipéptidos de la presente invención se pueden usar como materiales de vacunación en procedimientos para la creación y/o producción de anticuerpos anti-toxina Shiga sesgados. Técnicas de vacunación se pueden usar con composiciones que comprenden ciertos polipéptidos de la presente invención para conferir un mamífero con inmunidad activa a una futura infección por una toxina Shiga microorganismo productor u otra exposición a una toxina Shiga (ver Bosworth B et al, Infect Immun. 64: 55-60 (1996); Rabinovitz B et al, J Dairy Sci 95: 3318-26 (2012)). El diseño de vacunas puede tener en cuenta las diferencias entre los epítomos que provocan anticuerpos neutralizantes frente a los anticuerpos no neutralizantes con la posibilidad de anticuerpos no neutralizantes que interfieren con la protección, anticuerpos neutralizantes en un sujeto.

Por ejemplo, en un estudio de cinco anticuerpos para una holotoxina Shiga, sólo uno mostró actividad neutralizante y éste unido tanto el A y B subunidades (Él X et al, J Immunol 389 Procedimientos.: 18-28 (2013)). Del mismo modo para la toxina ricina AB, un anticuerpo neutralizante reconoce una interfaz entre el A y subunidades B y evita la liberación de un fragmento de una de sus subunidades (O'Hara J, Mantis N, J Immunol Methods 395: 71-8 (2013)).

Para los propósitos de vacunación, puede ser más favorable a los materiales de vacunas sesgo para provocar respuestas de anticuerpos principalmente a epítomos externos y/o epítomos que abarcan las interfaces de la subunidad A con la subunidad B en una estructura de holotoxina (O'Hara J, Mantis N, J Immunol Procedimientos 395.: 71-8 (2013); O'Hara J et al, Curr Top Microbiol Immunol 357: 209-41 (2012)). Por ejemplo, las vacunas a la ricina pueden haberse beneficiado de la eliminación de una región inmunogénica nativo que provoca sólo no protectores, anticuerpos no neutralizantes (Olsnes S, Toxicon 44: 361-70 (2004)). Del mismo modo, la eliminación de una región inmunodominante de la ricina podría tener respuestas de anticuerpos sesgados lejos de la producción de anticuerpos no neutralizantes para ciertos epítomos (O'Hara J et al, Vaccine 28.: 7035-46 (2010)) o incluso fuera de la toxina producir anticuerpos -Mejora (Maddaloni M et al, J Immunol. 172: 6221-8 (2004)). A tal fin, la eliminación de ciertos epítomos dentro de las regiones aisladas de la toxina Shiga A podría eliminar epítomos no deseados e impulsar la creación de anticuerpos de epítomos más deseables, tales como epítomos que abarcan las interfaces de toxina de subunidad Shiga.

Los polipéptidos de la presente invención útiles como inmunización parcial y/o materiales de vacunación pueden beneficiarse de la reducción y/o eliminaciones de las funciones efectoras de la toxina Shiga, como la actividad enzimática y/o citotoxicidad (Él X et al., J Immunol Methods 389 : 18-28 (2013); Skinner C et al, PLoS One. 9: e99854 (2014)). La reducción o eliminación de una función efectora de la toxina Shiga pueden llevarse a cabo mediante el uso de uno o más truncamientos y/o sustituciones de aminoácidos conocidas para el experto o descubiertos por el experto en la materia usando procedimientos bien conocidos. Además, la reducción o eliminación de una función de toxina Shiga efector puede llevarse a cabo mediante el uso de las sustituciones descritas en los Ejemplos que exhibió

atenuadas, reducen severamente, y/o pérdida de la actividad en un ensayo de efectora de la toxina Shiga, tal como, por ejemplo, la inhibición de ribosomas y específica citotoxicidad.

V. Variaciones en la secuencia del polipéptido de los polipéptidos y proteínas de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados

El experto en la materia reconocerá que pueden hacerse variaciones a los polipéptidos y proteínas de la región efectora de la toxina desinmunizados de la presente invención, y polinucleótidos que codifican cualquiera de la primera, sin disminuir sus actividades biológicas, por ejemplo, mediante el mantenimiento de la estructura general y función de la región efectora toxina en conjunción con alteraciones uno o más epítomos que reducen el potencial antigénico y/o inmunogénico. Por ejemplo, algunas modificaciones pueden facilitar la expresión, purificación, y/o propiedades farmacocinéticas, y/o inmunogenicidad. Tales modificaciones son bien conocidas para el experto e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de iniciación, los aminoácidos adicionales colocados en cualquier extremo para crear sitios convenientemente localizados de restricción o codones de terminación, y etiquetas de afinidad bioquímicos fusionados a cualquiera de los extremos para proporcionar la detección y/o purificación conveniente.

También se contempla en el presente documento es la inclusión de residuos de aminoácidos adicionales en el extremo amino y/o carboxi, tales como secuencias de epítomo etiquetas u otros restos. Los residuos de aminoácidos adicionales pueden ser utilizados para diversos fines incluyendo, por ejemplo, facilitar la clonación, facilitar la expresión, modificación post-traducciona, facilitando la síntesis, purificación, facilitar la detección, y la administración. Ejemplos de etiquetas de epítomo y restos están quitina de unión a dominios de proteínas, sitios enteropeptidasa de escisión, los sitios de escisión del Factor Xa, etiquetas flash, etiquetas FLAG, proteínas verde fluorescente (GFP), restos de glutatión-S-transferasa, etiquetas de HA, proteína de unión a maltosa no limitantes dominios, etiquetas myc, etiquetas, etiquetas de polihistidina reash, strep-tags, strep II, sitios de la proteasa TEV, los dominios de tiorredoxina, trombina sitio de escisión, y marcadores de epítomo V5.

En ciertas de las realizaciones anteriores, la secuencia de polipéptidos de los polipéptidos de-inmunizado Shiga región toxina efector y/o proteínas de la presente invención se varían por una o más sustituciones conservativas de aminoácidos introducidos en la región (s) polipéptido, siempre como al menos un aminoácido está interrumpida en al menos una región del epítomo de forma nativa posicionado proporcionada en este documento. Tal como se utiliza aquí, el término "sustitución conservativa" se refiere a que uno o más aminoácidos se sustituyen por otro, biológicamente residuo de aminoácido similar. Ejemplos incluyen la sustitución de residuos de aminoácidos con características similares, por ejemplo, aminoácidos pequeños, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos aromáticos (véase, por ejemplo, la Tabla B, infra). Un ejemplo de una sustitución conservativa con un residuo no se encuentran normalmente en, péptidos y proteínas de mamífero endógenos es la sustitución conservativa de un residuo de arginina o lisina con, por ejemplo, ornitina, canavanina, aminoetilcisteína, u otro aminoácido básico. Para más información relativa a sustituciones fenotípicamente silenciosas en los péptidos y las proteínas véase, por ejemplo, Bowie J et al, Science 247: 1306-1310 (1990).

TABLA B. Ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
A	D	H	C	F	N	A	C	F	A	C	A	A	D
G	E	K	I	W	Q	G	M	H	C	D	C	C	E
P	Q	R	L	Y	S	I	P	W	F	E	D	D	G
S	N		M		T	L		Y	G	H	G	E	K
T			V			V			H	K	N	G	P
									I	N	P	H	Q
									L	Q	S	K	R
									M	R	T	N	S
									R	S		Q	T
									T	T		R	
									V			S	
									W			P	
									Y			T	

En el esquema de sustitución conservativa en la Tabla B a continuación, las sustituciones conservativas de ejemplo de aminoácidos se agrupan por propiedades fisicoquímicas - I: neutro, hidrófilo; II: ácidos y amidas; III: básico; IV: hidrófobo; V: aminoácido aromáticos voluminosos, VI hidrófilo no cargado, VII alifático sin carga, VIII no polar no cargado, IX asociado a cicloalquenilo, X hidrófobo, XI polar, XII pequeño, XIII permite el giro, y XIV flexible. Por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen los siguientes: 1) S puede ser sustituido por C; 2) M o

L pueden ser sustituidos por F; 3) Y puede ser sustituido por M; 4) Q o E pueden ser sustituidos por K; 5) N o Q pueden ser sustituidos por H; y 6) H puede ser sustituido por N.

5 Las sustituciones conservativas de aminoácidos adicionales incluyen los siguientes: 1) S puede ser sustituido por C; 2) M o L pueden ser sustituidos por F; 3) Y puede ser sustituido por M; 4) Q o E pueden sustituirse por K; 5) N o Q pueden ser sustituidos por H; y 6) H puede ser sustituido por N.

10 En ciertas realizaciones tal como se definen en las reivindicaciones, los polipéptidos y/o proteínas de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados de la presente invención puede comprender fragmentos funcionales o variantes de una región de polipéptido de la presente invención que tienen, como máximo, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 sustituciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de polipéptido recitada en el presente documento, siempre que conserva una alteración de al menos un aminoácido en un epítipo de forma nativa posicionado región proporcionan en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5) y el tiempo que exhibe un nivel significativo de una función efectora de la toxina Shiga solo y/o como un componente de una composición terapéutica y/o diagnóstica. Tal como se define en las reivindicaciones, las variantes de los polipéptidos región toxina Shiga de-inmunizado y o proteínas/de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención como resultado del cambio de un polipéptido de la proteína de la presente invención mediante la alteración de uno o más amino ácidos o eliminar o insertar uno o más aminoácidos, tales como dentro de la región de unión o de la región efectora toxina Shiga, con el fin de conseguir las propiedades deseadas, tales como cambiado citotoxicidad, cambiado efectos citostáticos, cambiado la inmunogenicidad, y/o suero cambiado media vida. Una toxina Shiga polipéptido efector región de-inmunizado y/o un polipéptido de una proteína de la presente invención pueden ser adicionalmente con o sin una secuencia señal.

25 En ciertas realizaciones, los polipéptidos de-inmunizado toxina Shiga efectoras región y/o proteínas de las acciones de descripción al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de aminoácidos de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de una proteína recitada en el presente documento, siempre que conserva una alteración de al menos un aminoácido en una región epítipo nativa posicionado proporcionan en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4, y/o 5) y la actividad biológica medible, tal como citotoxicidad, unión extracelular biomolécula diana, catálisis enzimática, enrutamiento subcelular, o catalíticamente inactivación de los ribosomas.

30 En ciertas realizaciones, los polipéptidos y/o proteínas de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados de la presente invención pueden alterarse para cambiar la actividad enzimática y/o la citotoxicidad de la región efectora de la toxina Shiga siempre que al menos un aminoácido es alterada en una región epítipo nativa posicionado proporcionan en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4 y/o 5). Este cambio puede o no resultar en un cambio en la citotoxicidad del polipéptido de la región efectora toxina Shiga o la proteína citotóxica de la que la alteración región efectora de la toxina Shiga es un componente. Posibles alteraciones incluyen mutaciones en el polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga seleccionado del grupo que consiste en: un truncamiento, delección, inversión, inserción y sustitución, siempre y cuando al menos un aminoácido está interrumpida en una región epítipo nativa posicionado proporcionan en los ejemplos (tablas 1, 2, 3, 4 y/o 5).

40 La citotoxicidad de las subunidades de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede ser reducido o eliminado por mutación o truncamiento. Las posiciones de tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114, y triptófano-203 etiquetados han demostrado ser importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1, y Stx2 (Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al, Biochemistry 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al, Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al. , Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al, Microbiol Immunol. 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)). La mutación de ambos glutamato-167 y arginina-170 elimina la actividad enzimática de SLT-I A1 en un ensayo de ribosoma inactivación libre de células (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque utilizando la expresión de novo de SLT-I A1 en el retículo endoplásmico, mutando tanto glutamato-167 y arginina-170 eliminado SLT-I citotoxicidad fragmento A1 en ese nivel de expresión (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Un análisis de truncamiento demostró que un fragmento de stxA de los residuos 75 a 268 todavía conserva la actividad enzimática significativa in vitro (Haddad, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)). Un fragmento truncado de SLT-I A1 residuos que contengan 1-239 muestra actividad enzimática significativa in vitro y la citotoxicidad por la expresión de novo en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Expresión de un fragmento de SLT-I A1 truncada a los residuos 1-239 en el retículo endoplásmico no fue citotóxica porque no podía retrotranslocarse al citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

60 Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las toxina Shiga A Subunidades fueron asignadas a los siguientes residuos posiciones: asparagina-75, tirosina-77, tirosina-114, glutamato 167, arginina-170, arginina -176, y triptófano-203 entre otros (Di, Toxicon 57: 535-39 (2011)). En particular, una construcción de doble mutante de Stx2A que contiene glutamato-E167-a-lisina y arginina-176-a-lisina mutaciones estaba completamente inactivada; mientras que, muchas mutaciones individuales en Stx1 y Stx2 mostraron una reducción de 10 veces en la citotoxicidad. Además, el truncamiento de Stx1A a 1-239 o 1-240 redujo su citotoxicidad, y de manera similar, el truncamiento de Stx2A a un residuo hidrofóbico conservada redujo su citotoxicidad. Los residuos más críticos para los ribosomas eucariotas y/o inhibición ribosoma eucariótico de unión en la toxina Shiga A Subunidad han sido asignadas a los siguientes residuos posiciones: arginina-172, arginina-176, arginina-179, arginina-188, tirosina-189, valina-191 y leucina-233 entre otros (McCluskey A et al, PLoS One. 7: e31191 (2012)).

Los truncamientos de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 son catalíticamente activo, capaz de inactivar los ribosomas enzimáticamente in vitro, y citotóxico cuando se expresa dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). La toxina Shiga más pequeño Un fragmento de la subunidad que presenta actividad enzimática completa es un polipéptido compuesto de residuos 1-239 de SLT1 A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque el fragmento más pequeño de la toxina Shiga A Subunidad informó para retener actividad catalítica sustancial fue residuos 75-247 de stxA (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)), un truncamiento stxA expresaron de novo dentro de una célula eucariota requiere sólo hasta el residuo 240 para alcanzar el citosol y ejercer la inactivación catalítica de ribosomas (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

En ciertas realizaciones de los polipéptidos y/o proteínas de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizado de la presente invención derivadas de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), estos cambios incluyen la sustitución de la asparagina en la posición 75, tirosina en la posición 77, tirosina en la posición 114, el glutamato en la posición 167, arginina en la posición 170, arginina en la posición 176, y/o sustitución del triptófano en la posición 203. Ejemplos de tales sustituciones serán conocidos para el experto sobre la base de la técnica anterior, tales como asparagina en la posición 75 a alanina, tirosina en la posición 77 a serina, la sustitución de la tirosina en la posición 114 a serina, la sustitución de la glutamato en la posición 167 a glutamato, la sustitución de la arginina en la posición 170 a alanina, la sustitución de la arginina en la posición 176 a la lisina, y/o sustitución del triptófano en la posición 203 a alanina. Otras mutaciones que o bien aumentan o reducen la actividad y/o la citotoxicidad de la toxina Shiga enzimática están dentro del alcance de la presente invención y se pueden determinar usando técnicas y ensayos bien conocidos descritos en este documento.

Los polipéptidos de la región efectora de-inmunizado toxina Shiga y/o proteínas de la presente invención pueden estar opcionalmente conjugado con uno o más agentes adicionales que pueden incluir agentes terapéuticos y/o de diagnóstico conocidos en la técnica, incluyendo agentes tales como los descritos en el presente documento.

VI. Producción, fabricación y purificación de un polipéptido o proteína de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados

Los polipéptidos y las proteínas de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados de la presente invención pueden ser producidos utilizando técnicas de ingeniería bioquímicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos de región efectora de la toxina Shigaas y proteínas de la presente invención pueden fabricarse por procedimientos de síntesis estándar, mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes, o por cualquier otro procedimiento adecuado. Por lo tanto, los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga y proteínas de la presente invención pueden sintetizarse en un número de maneras, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que comprenden: (1) sintetizar un polipéptido o componente polipeptídico de una proteína utilizando en fase sólida estándar o metodología en fase líquida, o bien por etapas o por el conjunto de fragmento, y aislando y purificando el producto compuesto peptídico final; (2) que expresa un polinucleótido que codifica un componente de polipéptido o polipéptido de una proteína de la presente invención en una célula huésped y recuperar el producto de expresión de la célula huésped o cultivo de células huésped; o (3) en la expresión in vitro de un polinucleótido que codifica un componente de polipéptido o polipéptido de una proteína de la presente invención, y recuperar el producto de expresión libre de células; o por cualquier combinación de los procedimientos de (1), (2) o (3) para obtener fragmentos del componente peptídico, posteriormente de unión (por ejemplo, ligadura) los fragmentos para obtener el componente de péptido, y la recuperación del componente peptídico.

Puede ser preferible sintetizar un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizado o polipéptido o un componente de polipéptido de una proteína de la presente invención por medio de fase sólida o síntesis de péptidos en fase líquida. Polipéptidos y proteínas de la presente invención región efectora de toxina Shiga pueden adecuadamente ser fabricados por procedimientos sintéticos estándar. Así, los péptidos se pueden sintetizar por procedimientos, por ejemplo, que comprenden sintetizar el péptido por fase sólida estándar o metodología en fase líquida, el montaje fragmento ya sea paso a paso o por, y aislar y purificar el producto peptídico final. En este contexto, puede hacerse referencia a WO 1998/11125 o, entre otras cosas, Fields G et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis (péptidos sintéticos, Grant G, ed., Oxford University Press, Reino Unido, segundo ed., 2002) y los ejemplos de síntesis en el mismo.

Los polipéptidos y proteínas de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados de la presente invención pueden ser preparados (producidos y purificados) usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. En general, se describen en los procedimientos para preparar polipéptidos mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que comprende el polinucleótido que codifica y recuperar el polipéptido del cultivo de células, por ejemplo, Sambrook J et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (Press, NY, Estados Unidos, 1989); . Dieffenbach C et al, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., 1995). Cualquier célula huésped adecuada se puede usar para producir un polipéptido de la región efectora toxina Shiga y/o proteína de la presente invención. Las células huésped pueden ser células estable o transitoriamente transfectadas, transformadas, transducidas con uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de un polipéptido de la presente invención. Además, un polipéptido de toxina Shiga región efectora y/o proteína de la presente invención se pueden producir mediante la modificación del polinucleótido

que codifica un polipéptido o proteína de la presente invención que resultan en la alteración de uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos en con el fin de conseguir las propiedades deseadas, tales como cambio de citotoxicidad, cambió efectos citostáticos, cambió la inmunogenicidad, y/o se cambia la semivida en suero.

5 Hay una amplia variedad de sistemas de expresión que pueden ser seleccionados para producir una proteína de la presente invención. Por ejemplo, los organismos huésped para la expresión de proteínas de la presente invención incluyen procariotas, tales como E. coli y B. subtilis, células eucariotas, tales como levaduras y hongos filamentosos (como S. cerevisiae, P. pastoris, A. awamori, y K. lactis), algas (como C. reinhardtii), líneas celulares de insecto, células de mamífero (como células CHO), líneas celulares de la planta, y organismos eucariotas tales como plantas transgénicas (como A. thaliana y N. benthamiana).

10 Por consiguiente, la presente descripción también proporciona procedimientos para producir polipéptidos-de inmunizado Shiga región toxina efector y/o proteínas de la presente invención según los procedimientos anteriormente citados y el uso de una parte polinucleótido que codifica o la totalidad de un polipéptido de la presente invención o un polipéptido componente de una proteína de la presente invención, un vector de expresión que comprende al menos un polinucleótido de la presente invención capaz de codificar todo o parte de un polipéptido de la presente invención cuando se introduce en una célula huésped, y/o que comprende una célula huésped un vector polinucleótido o expresión de la presente invención.

15 Cuando un polipéptido o proteína se expresa utilizando técnicas recombinantes en una célula huésped o sistema libre de células, es ventajoso separar (o purificar) el polipéptido o proteína deseado de otros componentes, tales como factores de la célula huésped, con el fin para obtener preparaciones que son de alta pureza o sean sustancialmente homogéneas. La purificación se puede lograr por procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como técnicas de centrifugación, técnicas de extracción, cromatografía y técnicas de fraccionamiento (por ejemplo, separación por tamaños mediante filtración en gel, carga de separación por columna de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía en sílice o de intercambio catiónico resinas tales como DEAE y similares, cromatografía de exclusión, y proteína a Sepharose cromatografía para eliminar los contaminantes), y técnicas de precipitación (por ejemplo precipitación con etanol o precipitación con sulfato de amonio). Cualquier número de técnicas de purificación bioquímicas se puede usar para aumentar la pureza de un polipéptido de la región efectora toxina Shiga y/o proteína de la presente invención. En ciertas realizaciones, los polipéptidos y proteínas de la presente invención opcionalmente se pueden purificar en formas homo-multimérico (es decir, un complejo de proteínas de dos o más idénticos polipéptidos o proteínas de la presente invención).

20 En los ejemplos siguientes se encuentran descripciones de ejemplos de procedimientos no limitantes para la producción de una proteína de la presente invención, así como aspectos específicos, pero no limitativos, de la producción para las proteínas de ejemplo de la presente invención.

40 VII. Composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden un polipéptido o proteína de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados

La presente invención proporciona polipéptidos y proteínas para uso, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en una composición farmacéutica, para el tratamiento o la profilaxis de afecciones, enfermedades, trastornos o síntomas descritos en más detalle a continuación (por ejemplo, cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, anormalidades del crecimiento, trastornos inmunes, y las infecciones microbianas). La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido o proteína de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo, según la invención, junto con un vehículo, excipiente, o vehículo al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender formas homo-multimérico y/o hetero-multiméricos de los polipéptidos o proteínas de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas serán útiles en procedimientos de tratamiento, la mejora o la prevención de una enfermedad, afección, trastorno o síntoma se describe en más detalle a continuación. Cada uno de tales enfermedad, afección, trastorno o síntoma se prevé para ser una realización separada con respecto a los usos de una composición farmacéutica según la invención. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas para uso en al menos un procedimiento de tratamiento como se define en las reivindicaciones, como se describe en más detalle a continuación.

55 Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente para referirse a cualquier organismo, habitualmente vertebrados, tales como seres humanos y animales, que presenta síntomas, signos y/o indicaciones de al menos una enfermedad, trastorno o afección. Estos términos incluyen mamíferos, tales como los ejemplos, no limitantes, de primates, animales de ganado (por ejemplo, ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo ratones, conejos, ratas, etc.).

60 Tal como se usa en el presente documento, "tratar", "que trata" o "tratamiento" y las variantes gramaticales de los mismos se refieren a una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los términos pueden referirse a retardar la aparición o la velocidad de desarrollo de una afección, trastorno o enfermedad, reducir o aliviar

los síntomas asociados con los mismos, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de cualquiera de los anteriores. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, la reducción o alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (por ejemplo, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratar", "que trata" o "tratamiento" también pueden significar prolongar la supervivencia en relación con el tiempo de supervivencia esperado si no se recibe tratamiento. Un sujeto (por ejemplo un ser humano) en necesidad de tratamiento puede ser por tanto un sujeto ya aquejado de la enfermedad o trastorno en cuestión. Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" incluyen la inhibición o la reducción de un aumento en la gravedad de un estado o síntomas patológicos con respecto a la ausencia de tratamiento, y no está necesariamente destinado a implicar el cese completo de la enfermedad, trastorno o estado pertinentes. Con respecto a los tumores y/o cánceres, el tratamiento incluye reducciones en la carga tumoral global y/o el tamaño del tumor individual.

Tal como se usa en este documento, los términos "prevenir", "que previene", "prevención" y variantes gramaticales de los mismos se refieren a un procedimiento para prevenir el desarrollo de, o alterar la patología de, una afección, enfermedad o trastorno. En consecuencia, la "prevención" puede referirse a las medidas profilácticas o preventivas. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, la prevención o ralentización de los síntomas, progresión o desarrollo de una enfermedad, ya sea detectable o indetectable. Un sujeto (por ejemplo un ser humano) en necesidad de la prevención puede ser por tanto un sujeto aún no afectado por la enfermedad o trastorno en cuestión. El término "prevención" incluye retardar la aparición de la enfermedad en relación con la ausencia de tratamiento, y no está necesariamente destinado a implicar la prevención permanente de la enfermedad, trastorno o afección pertinentes. Por lo tanto "prevenir" o "prevención" de una enfermedad puede, en ciertos contextos, referirse a la reducción del riesgo de desarrollar la afección, o prevenir o retrasar la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad o dosis de una composición (por ejemplo, una composición o agente terapéutico) que produce al menos un efecto terapéutico deseado en un sujeto, tal como la prevención o el tratamiento de una afección objetivo o alivio beneficioso de un síntoma asociado con la enfermedad. La cantidad terapéuticamente eficaz más deseable es una cantidad que producirá una eficacia deseada de un tratamiento particular seleccionado por un experto en la técnica para un sujeto dado en necesidad del mismo. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores entendidos por el experto en la materia, incluyendo, pero no limitado a, las características del compuesto terapéutico (incluyendo actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluyendo edad, sexo, tipo de enfermedad, estadio de la enfermedad, condición física general, respuesta a una dosis dada y tipo de medicación), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables en la formulación y la vía de administración. Un experto en el sector clínico y farmacológico será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva a través de la experimentación de rutina, es decir, mediante el control de la respuesta de un sujeto a la administración de un compuesto y el ajuste de la dosificación en consecuencia (véase, por ejemplo Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro A, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, Estados Unidos, 19ª ed., 1995)).

Las composiciones de diagnóstico comprenden un polipéptido o proteína de la presente invención y agentes promotores de una o más de detección. Varios agentes de detección promoción son conocidos en la técnica, tales como isótopos, colorantes, agentes colorimétricos, agentes de contraste mejora, agentes fluorescentes, agentes bioluminiscentes y agentes magnéticos. Estos agentes se pueden incorporar en el polipéptido o proteína de la presente invención en cualquier posición. La incorporación del agente puede ser a través de un residuo (s) de aminoácidos de la proteína citotóxica o a través de algún tipo de enlace conocido en la técnica, incluyendo a través de enlazadores y/o quelantes. La incorporación del agente es de tal manera para permitir la detección de la presencia de la composición de diagnóstico en una pantalla, ensayo, procedimiento de diagnóstico, y/o técnica de imagen.

Cuando se produce o fabrica una composición de diagnóstico de la presente invención, una proteína de la invención puede unirse directa o indirectamente a uno o más agentes promotores de la detección. Hay numerosos agentes promotores de la detección conocidos para el experto que pueden unirse operativamente a las proteínas de la presente invención para los procedimientos de recopilación de información, tales como para aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, trastornos o afecciones de un organismo (véase, por ejemplo Cai W et al, J Nucl Med 48: 304-10 (2007); Nayak T, Brechbiel M, Bioconjug Chem. 20: 825-41 (2009); Paudyal P et al, Oncol Rep. 22: 115-9 (2009) ; Qiao J et al, PLoS ONE 6: e18103 (2011); Sano K et al, Breast Cancer Res. 14: R61 (2012)). Por ejemplo, los agentes promotores de la detección incluyen agentes de contraste que mejoran la imagen, tales como colorantes fluorescentes (por ejemplo Alexa680, verde de indocianina y Cy5.5), isótopos y radionúclidos, tales como ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ³²P, ⁵¹Mn, ⁵²mMn, ⁵²Fe, ⁵⁵Co, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁷³Se, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁸²mRb, ⁸³Sr, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁹⁴mTc, ⁹⁴Tc, ⁹⁹mTc, ¹¹⁰In, ¹¹¹In, ¹²⁰I, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁵⁴Gd, ¹⁵⁵Gd, ¹⁵⁶Gd, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵⁸Gd, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, y ²²³Rn, iones paramagnéticos, tales como cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III), metales, tales como lantano (III), oro (III), plomo (II) y bismuto (III), agentes que mejoran el contraste por ultrasonidos, tales como liposomas, agentes radiopacos, tales como compuestos de bario, galio y talio. Los agentes promotores de la detección pueden incorporarse directa o indirectamente usando un grupo funcional intermediario, tales como

quelantes como 2-bencil DTPA, PAMAM, NOTA, DOTA, TETA, análogos de los mismos, y equivalentes funcionales de cualquiera de los anteriores (ver Leyton J et al., Clin Cancer Res 14: 7488-96 (2008)).

5 Existen numerosas técnicas estándar conocidas para el experto para la incorporación, adhesión y/o conjugación de diversos agentes promotores de la detección a proteínas, especialmente a inmunoglobulinas y dominios derivados de inmunoglobulina (Wu A, Methods 65: 139-47 (2014)). De manera similar, hay numerosas estrategias de imágenes conocidas para el experto, tales como las técnicas de obtención de imágenes *in vivo* no invasivas comúnmente usadas en el campo médico, por ejemplo: formación de imágenes por tomografía computarizada (TC), formación de imágenes ópticas (incluyendo obtención de imágenes de forma directa, fluorescente y bioluminiscente), obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), ultrasonidos con tomografía computarizada por emisión de un solo fotón (SPECT) de ultrasonidos, y obtención de imágenes por tomografía computarizada con rayos X (ver Kaur S et al, Cancer Lett. 315: 97-111 (2012), para una revisión).

15 Producción o fabricación de una composición farmacéutica y/o la composición de diagnóstico que comprende un polipéptido o proteína de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizado

Las sales farmacéuticamente aceptables o solvatos de cualquiera de los polipéptidos y proteínas de la presente invención se dan a conocer asimismo en la presente memoria.

20 El término "solvato" en el contexto de la presente invención se refiere a un complejo de estequiometría definida formada entre un soluto (en este caso, un compuesto polipéptido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo) y un disolvente. El disolvente en esta conexión puede, por ejemplo, ser agua, etanol u otro farmacéuticamente aceptable, especies orgánicas típicamente pequeña moleculares, tales como, pero no limitado a, ácido acético o ácido láctico. Cuando el disolvente en cuestión es agua, un solvato de este tipo se conoce normalmente como un hidrato.

25 Los polipéptidos y proteínas de la presente invención, o sales de los mismos, se pueden formular como composiciones farmacéuticas preparadas para almacenamiento o administración, que típicamente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable portador. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. de Remington (A. Gennaro, ed., 1985). Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes fisiológicamente aceptables, es decir, compatible,, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antimicrobianos, isotónica, y agentes retardantes de la absorción, y similares. portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los usados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, y transdérmica). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensoactivos. En ciertas realizaciones, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta seleccionada de administración, la proteína citotóxica o de otro componente farmacéutico pueden recubrirse en un material destinado a proteger el compuesto de la acción de bajo pH y otras condiciones de inactivación natural a la que la proteína citotóxica activo puede encontrarse cuando se administra a un paciente por una ruta particular de administración.

50 Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. En dicha forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades discretas de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria puede ser también una cápsula, píldora o el propio comprimido, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas envasadas. Puede proporcionarse en forma inyectable de dosis única, por ejemplo en forma de una pluma. Las composiciones se pueden formular mediante cualquier vía y medios de administración adecuados. Los modos de administración subcutáneos o transdérmicos pueden ser particularmente adecuados para las proteínas terapéuticas descritas en este documento.

65 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También pueden ser deseables agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en

las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Una composición farmacéutica de la presente invención también incluye opcionalmente un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los antioxidantes farmacéuticamente aceptables de ejemplo son antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o una combinación de diferentes polipéptidos y/o proteínas de la invención, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 Las composiciones terapéuticas son típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, alcohol, tal como etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), o cualquier mezcla adecuada. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de agentes tensioactivos de acuerdo con la química de la formulación bien conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, pueden ser deseables en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede provocarse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

20 Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación intradérmica o subcutánea incluyen típicamente uno o más de: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes de ajuste de la tonicidad, tales como, por ejemplo, cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, o tampones con citrato, fosfato, acetato y similares. Dichas preparaciones se pueden encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados de vidrio o plástico.

30 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un polipéptido o proteína de la invención en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes descritos anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración con esterilización. Las dispersiones se pueden preparar mediante la incorporación de un compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión y los otros ingredientes, tales como los descritos anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo además de cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada estéril de los mismos.

40 Cuando se diseña una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido o proteína de la invención para ser administrada mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en forma de una solución acuosa libre de pirógenos parenteralmente aceptable. Los procedimientos para preparar soluciones de proteína parenteralmente aceptables, teniendo en consideración un pH, isotonicidad, estabilidad, y similares apropiados están dentro de la experiencia en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea contiene, además de agentes de unión, un vehículo isotónico, tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer con lactato, u otro vehículo conocido en la técnica. Una composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes, u otros aditivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

55 Tal como se describe en otra parte en el presente documento, un polipéptido o proteína de la presente invención se pueden preparar con vehículos que protegerán la composición contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulada. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (Robinson J, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, US, 1978)).

65 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención pueden formularse para asegurar una distribución deseada in vivo. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro excluye muchos compuestos grandes y/o hidrófilos. Para conseguir un compuesto terapéutico o composición de la presente invención a un particular en la

ubicación vivo, se pueden formular, por ejemplo, en liposomas que pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, mejorando así la administración dirigida de fármacos. Restos de direccionamiento ejemplares incluyen folato o biotina; manósidos; anticuerpos; la proteína surfactante A receptor; p120 catenina y similares.

Las composiciones farmacéuticas incluyen formulaciones parenterales diseñados para ser utilizados como implantes o sistemas de partículas. Los ejemplos de implantes son formulaciones de depósito compuestas de componentes poliméricos o hidrófobos tales como emulsiones, resinas de intercambio iónico, y soluciones de sales solubles. Ejemplos de sistemas de partículas son microesferas, micropartículas, nanocápsulas, nanoesferas, y nanopartículas (véase, por ejemplo Honda M et al, Int J Nanomedicine 8: 495-503 (2013); Sharma A et al, Biomed Res Int 2013:.. 960 821 (2013) ; Ramishetti S, Huang L, Ther Deliv 3: 1429-1445 (2012)). Formulaciones de liberación controlada se pueden preparar utilizando polímeros sensibles a iones, tales como, por ejemplo, liposomas, polaxamer 407, e hidroxiapatita.

VIII. Los polinucleótidos, vectores de expresión y células huésped

Más allá de los polipéptidos y proteínas de la presente invención, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos y proteínas de la presente invención, están dentro del alcance de la presente invención. El término "polinucleótido" es equivalente a la expresión "ácidos nucleicos" ambos de los cuales incluyen polímeros de ácidos desoxirribonucleicos (AND), polímeros de ácidos ribonucleicos (ARN), análogos de estos ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos. El polinucleótido de la presente invención puede ser simple, doble o triple hebra. Polinucleótidos descritos se dan a conocer específicamente para incluir todos los polinucleótidos capaces de codificar una proteína citotóxica ejemplar, por ejemplo, teniendo en cuenta la oscilación conocido para ser tolerado en la tercera posición de los codones de ARN, sin embargo, que codifica para el mismo aminoácido como un codón diferente de ARN (ver Stothard P, Biotechniques 28: 1102-4 (2000)).

En un aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican una toxina Shiga polipéptido de la región efectora de-inmunizado y/o una proteína de la presente invención. Los polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más, idéntica a un polipéptido que comprende una de las secuencias de aminoácidos de la proteína. La descripción también incluye polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que codifica el polipéptido de inmunizado Shiga región efectora toxina y/o una proteína de la presente invención, o un fragmento o derivado del mismo, o la antisentido o complemento de cualquiera de tales secuencia.

Los derivados o análogos de los polinucleótidos (o de-inmunizado polipéptidos región efectora de la toxina Shiga y/o proteínas) moléculas de la presente invención incluyen, entre otras cosas, polinucleótido (o polipéptido) que tienen regiones que son sustancialmente homólogas a los polinucleótidos, de- polipéptidos inmunizados toxina Shiga efectoras región, o proteínas de la presente invención, por ejemplo en al menos aproximadamente 45%, 50%, 70%, 80%, 95%, 98%, o incluso 99% de identidad (con una identidad preferida de 80-99 %) durante una secuencia de polinucleótido o polipéptido de la mismo tamaño o cuando se compara con una secuencia alineada en la que la alineación se hace por un programa de homología de ordenador conocido en la técnica. Un programa de ejemplo es el programa GAP (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Park Investigación, Madison, WI, EE.UU.) utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith T, Waterman M, Adv. Appl. Mates. 2: 482-9 (1981). También se incluyen polinucleótidos capaces de hibridar con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas de la presente invención en condiciones rigurosas (véase por ejemplo Ausubel F et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Nueva York, NY, US, 1993), y por debajo. Las condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden encontrarse en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY, US, Ch. Sec. 6.3.1-6.3.6 (1989)).

La presente invención proporciona además vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos dentro del alcance de la presente invención. Los polinucleótidos capaces de codificar los polipéptidos de-inmunizado toxina Shiga efectoras región y/o proteínas de la presente invención pueden insertarse en vectores conocidos, incluyendo plásmidos bacterianos, vectores virales y vectores de fago, utilizando material y procedimientos bien conocidos en la técnica para producir la expresión vectores. Tales vectores de expresión incluirán los polinucleótidos necesarias para apoyar la producción de polipéptidos y/o proteínas de la presente invención región efectora contemplada toxina Shiga dentro de cualquier célula huésped de elección o libres de células sistemas de expresión (por ejemplo pTx1 y pIVEX2.3 describen en los Ejemplos a continuación). Los polinucleótidos específicos que comprenden los vectores de expresión para su uso con tipos específicos de células huésped o sistemas de expresión libres de células son bien conocidos para una persona de experiencia ordinaria en la técnica, pueden determinarse utilizando experimentación de rutina, o pueden ser comprados.

El término "vector de expresión", como se usa aquí, se refiere a un polinucleótido, lineal o circular, que comprende una o más unidades de expresión. El término "unidad de expresión" se refiere a un segmento de polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y capaz de proporcionar la expresión del segmento de ácido nucleico en una célula huésped. Una unidad de expresión comprende típicamente un promotor de transcripción, un marco de lectura abierto

que codifica el polipéptido de interés, y un terminador de la transcripción, todos en configuración operativa. Un vector de expresión contiene una o más unidades de expresión. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, un vector de expresión que codifica un polipéptido de la toxina Shiga región efectora y/o una proteína que comprende una sola cadena de polipéptido (por ejemplo, un scFv genéticamente recombinado con una región efectora de la toxina Shiga) incluye al menos una unidad de expresión para la cadena polipeptídica única, mientras que una proteína que comprende, por ejemplo, dos o más cadenas de polipéptidos (por ejemplo, una cadena que comprende un V_L de dominio y una segunda cadena que comprende un V_H dominio vinculado a una región toxina efector) incluye al menos dos unidades de expresión, una para cada una de las dos cadenas de polipéptido de la proteína. Para la expresión de proteínas multi-cadena de la presente invención, una unidad de expresión para cada cadena de polipéptido también puede estar contenida por separado en diferentes vectores de expresión (por ejemplo, la expresión puede conseguirse con una única célula huésped en la que se ha introducido vectores de expresión para cada cadena de polipéptido) .

Los vectores de expresión capaces de dirigir la expresión transitoria o estable de polipéptidos y proteínas son bien conocidos en la técnica. Los vectores de expresión generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal heteróloga o péptido, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción, cada uno de los cuales es bien conocida en la técnica. Secuencias opcionales de regulación de control, secuencias de integración, y marcadores útiles que se pueden emplear son conocidos en la técnica.

El término "célula huésped" se refiere a una célula que puede apoyar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariontas, tales como E. coli o células eucarióticas (por ejemplo levaduras, insectos, anfibios, aves, o células de mamífero). Creación y aislamiento de líneas de células huésped que comprenden un polinucleótido de la presente invención o capaz de producir un polipéptido y/o proteína de la presente invención puede llevarse a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica.

De inmunizados polipéptidos y/o proteínas región efectora de la toxina Shiga dentro del alcance de la presente invención pueden ser variantes o derivados de los polipéptidos y proteínas descritos en este documento que son producidas por la modificación del polinucleótido que codifica un polipéptido y/o proteína alterando uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos que pueden hacer que sea más adecuado para lograr las propiedades deseadas, tales como la expresión más óptima por una célula huésped.

IX. Dispositivos de administración y Kits

En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a un dispositivo que comprende una o más composiciones de materia descritos en este documento, tales como una composición farmacéutica, para la entrega a un sujeto. Por lo tanto, un dispositivo de suministro que comprende uno o más compuestos de la presente invención se puede usar para administrar a un paciente una composición de materia por diversos procedimientos de entrega, incluyendo: intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal; administración oral; la administración transdérmica; administración pulmonar o transmucosa; administración por implante, bomba osmótica, cartucho o bomba de micro; o por otros medios reconocidos por una persona de experiencia en la técnica.

También dentro del alcance de la presente invención son kits que comprenden al menos una composición de materia tal como se define en las reivindicaciones, y opcionalmente, el embalaje y las instrucciones de uso. Kits pueden ser útiles para la administración del fármaco y/o la recogida de información de diagnóstico. Un kit de la presente invención puede comprender opcionalmente al menos un reactivo adicional (por ejemplo, estándares, marcadores y similares). Kits típicamente incluyen una etiqueta que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El kit puede comprender además reactivos y otras herramientas para la detección de un tipo de célula (por ejemplo, células tumorales) en una muestra o en un sujeto, o para el diagnóstico de si un paciente pertenece a un grupo que responde a una estrategia terapéutica que hace uso de un compuesto, composición o el procedimiento relacionado de la presente invención como se describe aquí.

X. Procedimientos para el uso de un polipéptido o proteína de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados o una composición farmacéutica y/o de diagnóstico de los mismos

En general, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes farmacológicamente activos, así como composiciones que comprenden los mismos, que pueden utilizarse en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, trastornos y condiciones, tales como ciertos tipos de cáncer, tumores, anomalías en el crecimiento, trastornos inmunes, o más condiciones patológicas mencionadas en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos in vitro de la utilización de los polipéptidos, las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención para la ejecución selectiva de las células, para la entrega de materiales exógenos adicionales en las células diana, y para el etiquetado de los interiores de las células diana. La invención proporciona también para la recogida de información de diagnóstico, y para el tratamiento de enfermedades, trastornos y condiciones como se describe aquí.

En particular, es un objeto de la presente invención proporcionar tales agentes farmacológicamente activos, composiciones y/o procedimientos que tienen ciertas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o

procedimientos que se conocen actualmente en la técnica. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos como se define en las reivindicaciones de la utilización de polipéptidos y proteínas con secuencias de polipéptidos especificados y composiciones farmacéuticas de los mismos. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias polipeptídicas en SEQ ID NOs: 4-59 puede utilizarse específicamente como un componente de la proteína usada en los procedimientos siguientes.

La presente invención proporciona procedimientos *in vitro* para destruir una célula que comprende la etapa de poner en contacto la célula, con un polipéptido, proteína o composición farmacéutica de la presente invención como se define en las reivindicaciones. Los polipéptidos, proteínas, y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para matar a un tipo específico de célula en contacto una célula o células con una de las composiciones reivindicadas de la materia. En ciertas realizaciones, un polipéptido citotóxico, proteínas, o composición farmacéutica de la presente invención puede ser usado para matar tipos específicos de células en una mezcla de diferentes tipos de células, tales como mezclas que comprenden las células cancerosas, las células infectadas, y/o células hematológicas. En ciertas realizaciones, un polipéptido citotóxico, proteínas, o composición farmacéutica de la presente invención se pueden utilizar para matar las células cancerosas en una mezcla de diferentes tipos de células. En ciertas realizaciones, un polipéptido citotóxico, proteínas, o composición farmacéutica de la presente invención puede ser usado para matar tipos específicos de células en una mezcla de diferentes tipos de células, tales como tejidos pre-trasplante. En ciertas realizaciones, una composición de polipéptido, proteína o farmacéutica de la presente invención puede ser usado para matar tipos específicos de células en una mezcla de tipos de células, tales como material de tejido pre-administración con fines terapéuticos. En ciertas realizaciones, un polipéptido, proteína o composición farmacéutica de la presente invención se pueden utilizar para matar selectivamente las células infectadas por virus o microorganismos, o de lo contrario matar selectivamente células que expresan una biomolécula diana extracelular particular, tal como una biomolécula superficie celular. Los polipéptidos, proteínas, y las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, utiliza en ozono tipos de células no deseadas de los tejidos, ya sea *in vitro* o *in vivo*, los usos en la modulación de la respuesta inmunitaria para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, usa como agentes antivirales, usos como agentes anti-parasitarios, y usos en purgar los tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas.

En ciertas realizaciones, un polipéptido citotóxico, proteínas, o composición farmacéutica de la presente invención, solo o en combinación con otros compuestos o composiciones farmacéuticas, pueden mostrar actividad de las células-kill potente cuando se administra a una población de células, *in vitro* o *in vivo* en un sujeto, tal como en un paciente en necesidad de tratamiento. Al dirigirse a la entrega de las regiones de la toxina Shiga enzimáticamente activas utilizando regiones de unión a tipos de células específicos de alta afinidad, esta actividad de las células-kill potente puede ser restringido para matar específicamente y selectivamente ciertos tipos de células dentro de un organismo, tales como ciertas células cancerosas, células neoplásicas, células malignas, células tumorales no malignas, o células infectadas.

La presente descripción proporciona un procedimiento para matar una célula en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente al menos un polipéptido citotóxico o proteína de la presente invención, o una composición farmacéutica del mismo.

Ciertas realizaciones de las composiciones de polipéptido citotóxico, proteína o farmacéuticas de los mismos se pueden utilizar para matar una célula de cáncer en un paciente por la orientación de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplado físicamente con una célula de cáncer o tumor. Los términos "celulares de cáncer" o "célula cancerosa" se refiere a diversas células neoplásicas que crecen y se dividen de una forma anormalmente acelerado y estará claro para la persona experta. El término "célula tumoral" incluye tanto las células malignas y no malignas. En general, los cánceres y/o tumores pueden ser definidas como enfermedades, trastornos o condiciones que son susceptibles de tratamiento y/o prevención. Los cánceres y tumores (ya sea malignas o no malignas) que están comprendidos por las células cancerosas y/o células tumorales serán evidentes para la persona experta. Las células neoplásicas se asocian a menudo con uno o más de los siguientes: crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión de tejido local, la angiogénesis y la metástasis.

Ciertas realizaciones de la polipéptido citotóxico o proteína de la presente invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se pueden utilizar para matar a una célula inmune (ya sea sano o maligno) en un paciente por la orientación de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplado físicamente con una célula inmune.

Ciertas realizaciones de la polipéptido citotóxico o proteína de la presente invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se pueden utilizar para matar una célula infectada en un paciente mediante la orientación de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplado físicamente con una célula infectada.

Está dentro del alcance de la presente invención la utilización de la proteína de la composición de la presente invención o farmacéutica del mismo para los fines de purga poblaciones de células de pacientes (por ejemplo, médula ósea) del maligno, neoplásico, o las células T de lo contrario no deseados y/o las células B y luego la reinfusión de la célula T y/o células B de material empobrecido en el paciente (véase, por ejemplo van Heeckeren W et al, Br J Haematol 132: 42-55 (2006); (véase, por ejemplo Alpdogan o, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).

- 5 Está dentro del alcance de la presente invenci3n la utilizaci3n de la prote3na de la composici3n de la presente invenci3n o farmac3utica del mismo para los fines de ex vivo agotamiento de las c3lulas T y/o c3lulas B a partir de poblaciones de c3lulas aisladas extra3das de un paciente. En un ejemplo no limitante, la prote3na de la presente invenci3n se puede usar en un procedimiento para la profilaxis de 3rgano y/o rechazo de trasplante de tejido en el que el 3rgano o tejido del donante se perfunde antes del trasplante con una prote3na citot3xica de la presente invenci3n o una composici3n farmac3utica los mismos a fin de purgar el 3rgano de c3lulas T de donante y/o las c3lulas B (v3ase, por ejemplo Alpdogan o, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).
- 10 Tambi3n está dentro del alcance de la presente invenci3n utilizar la prote3na de la composici3n de la presente invenci3n o farmac3utica del mismo para los fines de ozono c3lulas T y/o c3lulas B a partir de una poblaci3n de c3lulas de donantes como profilaxis contra injerto contra enfermedad -host, y la inducci3n de la tolerancia, en un paciente que someterse a una m3dula 3sea y o trasplante de c3lulas madre (v3ase, por ejemplo van Heeckeren W et al, Br J Haematol 132: 42-55 (2006); (v3ase, por ejemplo Alpdogan o, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).
- 15 Ciertas realizaciones de la polip3ptido citot3xico o prote3na de la presente invenci3n, o composiciones farmac3uticas de los mismos, se pueden utilizar para matar una c3lula infectada en un paciente mediante la orientaci3n de una biomol3cula extracelular que se encuentra acoplado f3sicamente con una c3lula infectada.
- 20 Adicionalmente, la presente descripci3n proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad, trastorno, o afecci3n en un paciente, que comprende la etapa de administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terap3uticamente eficaz de al menos uno del polip3ptido citot3xico o prote3na de la presente invenci3n, o una composici3n farmac3utica del mismo. Enfermedades contempladas, trastornos y condiciones que pueden ser tratadas mediante este procedimiento incluyen c3nceres, tumores malignos, tumores no malignos, anormalidades de crecimiento, trastornos del sistema inmune, y las infecciones microbianas. La administraci3n de una "dosis terap3uticamente eficaz" de un compuesto de la presente invenci3n puede resultar en una disminuci3n de la severidad de s3ntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duraci3n de los per3odos libres de s3ntomas de enfermedad, o una prevenci3n de deterioro o discapacidad debido a la aflicci3n enfermedad .
- 25 La cantidad terap3uticamente eficaz de un compuesto de la presente invenci3n dependerá de la v3a de administraci3n, el tipo de mam3fero a tratar, y las caracter3sticas f3sicas del paciente espec3fico en consideraci3n. Estos factores y su relaci3n para determinar esta cantidad son bien conocidos para los expertos en las t3cnicas m3dicas. Esta cantidad y el procedimiento de administraci3n pueden adaptarse para conseguir una eficacia 3ptima, y pueden depender de factores tales como peso, dieta, medicaci3n concurrente y otros factores, bien conocido por los expertos en las t3cnicas m3dicas. El r3gimen de dosificaci3n y tama3os de dosificaci3n más apropiados para uso humano puede ser guiado por los resultados obtenidos por la presente invenci3n, y se puede confirmar en ensayos cl3nicos dise3ados adecuadamente. Un protocolo de dosificaci3n y tratamiento eficaz se puede determinar por medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y luego aumentando la dosis mientras que el seguimiento de los efectos, y variando sistem3ticamente el r3gimen de dosificaci3n tambi3n. Numerosos factores pueden ser tomados en consideraci3n por un cl3nico cuando se determina una dosis 3ptima para un sujeto dado. Estas consideraciones son conocidas para el experto.
- 30 Una v3a de administraci3n aceptable puede referirse a cualquier v3a de administraci3n conocida en la t3cnica, incluyendo, pero no limitado a aerosol, enteral, nasal, oft3lmica, oral, parenteral, rectal, vaginal, o transd3rmica (por ejemplo, la administraci3n t3pica de una crema, gel o pomada, o por medio de un parche transd3rmico). "Administraci3n parenteral" se asocia t3picamente con inyecci3n a o en comunicaci3n con el sitio de acci3n deseado, incluyendo infraorbital, infusi3n, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intrad3rmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcut3nea, transmucosal, o administraci3n transtraqueal.
- 35 Para la administraci3n de una composici3n farmac3utica de la presente invenci3n, el intervalo de dosis será generalmente de aproximadamente 0,0001 a 100 miligramos por kilogramo (mg/kg), y más, por lo general de 0,01 a 5 mg/kg, de peso corporal del hu3sped. Dosificaciones ejemplares pueden ser 0,25 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un r3gimen de tratamiento ejemplar es una administraci3n una vez o dos veces al d3a, o una administraci3n una o dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos o tres meses o una vez cada tres a 6 meses. Las dosificaciones pueden ser seleccionados y reajustados por el profesional como se requiere para maximizar el beneficio terap3utico para un paciente particular cuidado de la salud experto.
- 40 Las composiciones farmac3uticas de la presente invenci3n t3picamente serán administrados al mismo paciente en m3ltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, 2-5 d3as, semanas, meses, cada dos o tres meses, cada seis meses o cada a3o. Los intervalos entre administraciones tambi3n pueden ser irregulares, basado en la regulaci3n de los niveles en sangre u otros marcadores en el sujeto o paciente. Los r3gimenes de dosificaci3n para un compuesto de la presente invenci3n incluyen la administraci3n intravenosa de 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal con el compuesto administrado cada dos a cuatro semanas durante seis dosis, a continuaci3n, cada tres meses en el peso corporal/kg 3 mg o 1 mg/kg de peso corporal.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Una composición farmacéutica de la presente invención pueden administrarse mediante una o más vías de administración, utilizando una o más de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para los polipéptidos, las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal, u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. En otras realizaciones, un polipéptido, proteína o composición farmacéutica de la presente invención se pueden administrar por una vía no parenteral, tal como una tópica, epidérmica o vía mucosa de administración, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, o por vía tópica.

Los polipéptidos, proteínas, o composiciones farmacéuticas terapéuticas de la presente invención se pueden administrar con una o más de una variedad de dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención son en la técnica, incluyendo, por ejemplo, bombas de micro-infusión implantables para la entrega de velocidad controlada; dispositivos para la administración a través de la piel; Las bombas de infusión para la entrega a una velocidad de infusión precisa; dispositivos de infusión de flujo implantable variables para la administración de fármacos continua; y sistemas de administración de fármacos osmótico. Estos y otros implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

Un polipéptido, composición de proteína, o farmacéutica de la presente invención se puede administrar solo o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Una terapia de combinación puede incluir una proteína citotóxica de la composición de la presente invención o farmacéutica del mismo en combinación con al menos otro agente terapéutico seleccionado en base a la paciente en particular, la enfermedad o condición a ser tratada. Ejemplos de otros tales agentes incluyen, entre otras cosas, un citotóxico, anti-cáncer o agente quimioterapéutico, un agente anti-inflamatorio o antiproliferativo, un agente antimicrobiano o antiviral, factores de crecimiento, citoquinas, un analgésico, una molécula pequeña terapéuticamente activo o polipéptido, un anticuerpo de cadena, un anticuerpo clásica o fragmento del mismo, o una molécula de ácido nucleico que modula una o más vías de señalización, y la terapéutica de modulación similares que pueden complementar o ser beneficioso en un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico de otra manera.

El tratamiento de un paciente con un polipéptido, proteína o composición farmacéutica de la presente invención conduce preferiblemente a la muerte celular de las células diana y/o la inhibición del crecimiento de células diana. Como tales proteínas, citotóxicos de la presente invención, y composiciones farmacéuticas que los comprenden, serán útiles en procedimientos para tratar una variedad de trastornos patológicos en los que matar o agotamiento de las células diana puede ser beneficioso, tales como, entre otros, cáncer, tumores, otro crecimiento alteraciones, trastornos inmunes y células infectadas. La presente descripción proporciona procedimientos para la supresión de la proliferación celular, y el tratamiento de trastornos de células, incluyendo neoplasia, células B hiperactivos, y las células T hiperactivas.

En ciertas realizaciones, polipéptidos, proteínas, y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir cánceres, tumores (malignos y no malignos), anomalías de crecimiento, trastornos del sistema inmune, y las infecciones microbianas. En un aspecto adicional, el procedimiento ex vivo anteriores pueden combinarse con lo anterior procedimiento in vivo para proporcionar procedimientos de tratamiento o prevención del rechazo en receptores de trasplante de médula ósea, y para el logro de la tolerancia inmunológica.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona procedimientos para tratar tumores malignos o neoplasmas y otros cánceres de células sanguíneas asociadas en un sujeto mamífero, como un ser humano, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de proteína o farmacéutica citotóxica de la presente invención.

Los polipéptidos, proteínas y composiciones farmacéuticas citotóxicos de la presente invención tiene aplicaciones variadas, incluyendo, por ejemplo, utilidades en la eliminación de células T no deseadas, utiliza en la modulación de la respuesta inmunitaria para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, utiliza como agentes antivirales, los usos como agentes antimicrobianos, y usos en purgar los tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas. Los citotóxicos polipéptidos, proteínas, y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son agentes comúnmente anti-neoplásicas - lo que significa que son capaces de tratar y/o prevenir el desarrollo, la maduración, o la propagación de células neoplásicas o malignas mediante la inhibición del crecimiento y/o causar la muerte de las células cancerosas o tumorales.

En ciertas realizaciones, un polipéptido, para su uso en el tratamiento de un B-por células, por células de plasma o el anticuerpo de la enfermedad o trastorno mediado, tal como por ejemplo leucemia, linfoma, mieloma, enfermedades relacionadas con el virus de inmunodeficiencia humana, amiloidosis, síndrome urémico hemolítico, poliarteritis, choque séptico, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriática, colitis ulcerosa,

psoriasis, asma, síndrome de Sjögren, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, diabetes, vasculitis, esclerodermia y lupus sistémico eritematoso.

5 En otro aspecto, ciertas realizaciones de los polipéptidos, las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención son agentes antimicrobianos - lo que significa que son capaces de tratar y/o prevenir la adquisición, el desarrollo, o las consecuencias de las infecciones de patógenos microbiológicos, tales como causadas por virus, bacterias, hongos, priones, o protozoos.

10 Está dentro del alcance de la presente invención es proporcionar una profilaxis o tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por células T o células B mediante el uso de la proteína citotóxica o la invención, o una composición farmacéutica del mismo, en un paciente para el propósito de matar las células T o células B en el paciente. Este uso es compatible con la preparación o el acondicionamiento de un paciente para el trasplante de médula ósea, trasplante de células madre, trasplante de tejidos, o el trasplante de órganos, independientemente de la fuente del material trasplantado, por ejemplo, de fuentes humanas o no humanas.

15 Está dentro del alcance de la presente invención es proporcionar un receptor de médula ósea para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad de huésped contra injerto a través de la destrucción celular específica de células T del huésped utilizando un polipéptido citotóxico, proteína o composición farmacéutica de la presente invención.

20 Los polipéptidos, proteínas, y composiciones farmacéuticas citotóxicos de la presente invención pueden ser para uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente, en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido citotóxico, proteína o composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones de la presente invención, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso (tales como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), cáncer de mama, cáncer de centro/sistema nervioso periférico (tales como cáncer de cerebro, neurofibromatosis, o glioblastoma), cáncer gastrointestinal (tales como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (tales como los cánceres de ovario y cánceres testiculares, cáncer de glandular (como el cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de la glándula salival, o cáncer de tiroides), la cabeza con cuello cáncer (como cáncer de la nasofaringe, cáncer oral, o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (tales como leucemia, linfoma o mieloma), cáncer del tracto renal-urinario (como el cáncer renal y cáncer de vejiga), cáncer de hígado, pulmón/cáncer de pleura (por ejemplo, mesotelioma, carcinoma de pulmón de células pequeñas, o carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata, sarcoma (tales como angiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, o sarcoma sinovial), de la piel c l cáncer (tal como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o melanoma), y cáncer de útero.

35 Los polipéptidos, proteínas, y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser para uso en un procedimiento para tratar un trastorno inmune que comprende la administración a un paciente, en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína citotóxica o una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones de la presente invención, el trastorno inmune está relacionada con una inflamación asociada a una enfermedad seleccionada de entre el grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, de Hashimoto tiroiditis, síndrome urémico hemolítico, enfermedades relacionadas con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, la colitis ulcerosa, y vasculitis.

45 Entre ciertas realizaciones de la presente invención es polipéptido o proteína de la presente invención como un componente de una composición farmacéutica o medicamento para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, otra anomalía de crecimiento, trastorno inmune, y/o microbiana infección. Por ejemplo, trastornos del sistema inmune que presentan en la piel de un paciente pueden tratarse con un medicamento tal en los esfuerzos para reducir la inflamación. En otro ejemplo, tumores de la piel pueden ser tratados con un medicamento tal en los esfuerzos para reducir el tamaño del tumor o eliminar el tumor por completo.

50 Los efectos clínicos beneficiosos pueden obtenerse por los regímenes de tratamiento que implican la administración secuencial de múltiples proteínas citotóxicas de la presente invención para el mismo tema, donde cada proteína citotóxica comprende una región efectora de la toxina Shiga de inmunizados en una región diferente con el fin de evitar o reducir el desarrollo de una respuesta prolongada inmune (s) a una sola proteína citotóxica de los regímenes de tratamiento que implican la administración en serie de un agente terapéutico idéntico.

60 Ciertos polipéptidos citotóxicos, las proteínas y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse en aplicaciones de neurocirugía molecular, tales como inmunolesioning y rastreo neuronal (véase, Wiley R, Lappi D, Adv Drug Deliv Rev 55: 1043-1054 (2003), para la revisión). Por ejemplo, el dominio de dirección puede ser seleccionado o se deriva de diversos ligandos, tales como los neurotransmisores y neuropéptidos, que se dirigen a tipos de células neuronales específicas por receptores de la superficie neuronales, tales como un determinado receptor acoplado a proteína G circuito neuronal de unión. Del mismo modo, el dominio de dirección puede seleccionarse de o derivados de anticuerpos que se unen los receptores de superficie neuronales. Debido a que las toxinas Shiga dirigen robustamente su propio transporte axonal retrógrado, ciertas proteínas citotóxicos de la presente invención pueden usarse para matar una neurona (s) que expresa la diana extracelular en un sitio de la inyección de proteína citotóxica

distante del cuerpo de la celda (ver Llewellyn-Smith I et al., J Neurosci Procedimientos 103: 83-90 (2000)). Estos neuronal de células de tipo específico de metas de polipéptidos citotóxicos y proteínas tienen usos en investigación en neurociencias, tales como para elucidar los mecanismos de sensaciones (véase, por ejemplo Mishra S, Hoon M, Ciencia 340: 968-71 (2013)), y la creación de sistemas modelo de enfermedades neurodegenerativas, tales como el Parkinson y el Alzheimer (véase, por ejemplo Hamlin A et al., PLoS One e53472 (2013)).

Entre ciertas realizaciones de la presente descripción es un procedimiento de uso de un polipéptido, proteína, composición farmacéutica y/o composición de diagnóstico de la presente invención para etiquetar o detectar los interiores de las células neoplásicas y/o tipos de células inmunes. Basado en la capacidad de ciertos polipéptidos, proteínas, y las composiciones farmacéuticas de la presente invención para entrar en tipos de células específicos y ruta dentro de las células a través de transporte intracelular retrógrado, los compartimientos interiores de tipos específicos de células están etiquetados para la detección. Esto se puede realizar en células in situ dentro de un paciente o en las células y los tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

Entre cierta realización de la presente descripción es un procedimiento de uso de un polipéptido, proteína, composición farmacéutica y/o composición de diagnóstico de la presente invención para detectar la presencia de un tipo de célula con el propósito de la recopilación de información en relación con enfermedades, condiciones y/o trastornos. El procedimiento comprende poner en contacto una célula con una cantidad diagnósticamente suficiente de una molécula citotóxica para detectar la molécula citotóxica mediante un ensayo o una técnica de diagnóstico. La frase "cantidad diagnósticamente suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona una detección adecuada y la medición precisa para la recopilación de información fines por el ensayo particular o técnica de diagnóstico utilizado. Generalmente, la cantidad diagnósticamente suficiente para todo el organismo uso diagnóstico in vivo será una dosis no acumulada de entre 0,1 mg a 100 mg del agente de detección promover vinculado proteína de la presente invención por kg de sujeto por sujeto. Típicamente, la cantidad de polipéptido o proteína de la presente invención utilizada en estos procedimientos de recopilación de información será tan bajo como sea posible siempre que todavía es una cantidad diagnósticamente suficiente. Por ejemplo, para la detección in vivo en un organismo, la cantidad de polipéptido, proteína o composición farmacéutica de la presente invención administrada a un sujeto será tan bajo como factiblemente posible.

La orientación específica de tipo celular de polipéptidos y proteínas de la presente invención en combinación con agentes de detección promover proporciona una manera de detectar y celdas de imagen acoplados físicamente con una biomolécula diana extracelular de una región de unión de la molécula de la presente invención. Obtención de imágenes de células usando los polipéptidos o proteínas de la presente invención puede llevarse a cabo in vitro o in vivo mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. La información de diagnóstico puede ser recogida utilizando diversos procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo formación de imágenes de todo el cuerpo de un organismo o ex vivo utilizando muestras tomadas de un organismo. El término "muestra" se utiliza aquí se refiere a cualquier número de cosas, pero no limitado a, fluidos tales como sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales, secreciones vaginales, y el semen, y los tejidos obtenidos por procedimientos de biopsia. Por ejemplo, varios agentes de detección promoción se pueden utilizar para no invasiva imágenes de tumores in vivo mediante técnicas tales como resonancia magnética (MRI), procedimientos ópticos (tales como directa, fluorescente y bioluminiscente de imágenes), la tomografía por emisión de positrones (PET), emisión de fotón único tomografía computarizada (SPECT), ultrasonidos, computarizada de rayos x de tomografía, y combinaciones de lo anterior (véase, Kaur S et al, Cancer Lett. 315: 97-111 (2012), para revisión).

Entre ciertas realizaciones de la presente descripción es un procedimiento de uso de un polipéptido, proteína o composición farmacéutica de la presente invención como una composición de diagnóstico para etiquetar o detectar los interiores de cáncer, tumor, y/o tipos de células inmunes (ver por ejemplo, , Koyama Y et al, Clin Cancer Res 13: 2936-45 (2007); Ogawa M et al, Cancer Res. 69: 1268-1272 (2009); Yang L et al, Pequeño 5: 235-43 (2009)). Basado en la capacidad de ciertos polipéptidos, proteínas, y las composiciones farmacéuticas de la presente invención para entrar en tipos de células específicos y ruta dentro de las células a través de transporte intracelular retrógrado, los compartimientos interiores de tipos específicos de células están etiquetados para la detección. Esto se puede realizar en células in situ dentro de un paciente o en las células y los tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

Las composiciones de diagnóstico de la presente invención pueden utilizarse para caracterizar una enfermedad, trastorno, o condición como potencialmente tratable mediante una composición farmacéutica relacionada de la presente invención. Ciertas composiciones de materia de la presente invención se pueden usar para determinar si un paciente pertenece a un grupo que responde a una estrategia terapéutica que hace uso de un compuesto, composición o el procedimiento relacionado de la presente invención como se describe en este documento o se adapta bien para el uso de una entrega dispositivo dado a conocer en el presente documento.

Las composiciones de diagnóstico de la presente invención pueden ser utilizadas después de una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, se detecta con el fin de caracterizar mejor que, como para monitorizar metástasis distantes, la heterogeneidad, y la etapa de progresión del cáncer. La evaluación fenotípica de los trastornos de la enfermedad o la infección puede ayudar pronóstico y predicción durante la toma de decisiones terapéuticas. En la recurrencia de la

enfermedad, ciertos procedimientos de la presente invención pueden ser utilizados para discriminar localizada frente a problemas sistémicos.

5 Las composiciones de diagnóstico de la presente invención pueden ser usados para evaluar las respuestas a terapéutico(s), independientemente del tipo de droga terapéutica, por ejemplo de moléculas pequeñas, fármacos biológicos, o terapia basada en células. Por ejemplo, ciertas formas de realización de los diagnósticos de la presente invención pueden ser utilizados para medir los cambios en el tamaño del tumor, los cambios en las poblaciones de células positivas de antígeno, incluyendo el número y la distribución, o el seguimiento de un marcador diferente que el antígeno blanco de una terapia ya se administran a un paciente (ver Smith-Jones P et al, Nat Biotechnol 22: 701-6 (2004); Evans M et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 108: 9578-82 (2011)).

10 Ciertas realizaciones del procedimiento utilizado para detectar la presencia de un tipo celular pueden utilizarse para reunir información con respecto a las enfermedades, trastornos y condiciones, tales como, por ejemplo el cáncer de hueso (tales como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), cáncer de mama , periférica cáncer sistema central/nervioso (tales como cáncer de cerebro, neurofibromatosis, o glioblastoma), cáncer gastrointestinal (tales como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (tales como los cánceres de ovario y cánceres testiculares, cáncer de glandular (como el cáncer de páncreas , cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de la glándula salival, o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza-cuello (como el cáncer nasofaríngeo, cáncer oral, o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (tales como leucemia, linfoma o mieloma), del tracto renal-urinario cáncer (como el cáncer renal y cáncer de vejiga), cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura (por ejemplo, mesotelioma, carcinoma de pulmón de células pequeñas, o carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata, sarcoma (por ejemplo, angi osarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, o sarcoma sinovial), cáncer de piel (tales como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o melanoma), cáncer de útero, el SIDA, la amiloidosis, la espondilitis anquilosante, asma, autismo, cardiogénesis, enfermedad de Crohn, diabetes, eritematoso, gastritis, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de grave, tiroiditis de Hashimoto, síndrome hemolítico urémico, las enfermedades relacionadas con el VIH, lupus eritematoso sistémico, trastornos linfoproliferativos, esclerosis múltiple, miastenia grave, inflamación neuro, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica , artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, vasculitis, la proliferación celular, la inflamación, la activación de leucocitos, la adhesión de leucocitos, la quimiotaxis de leucocitos, la maduración de los leucocitos, la migración de leucocitos, la diferenciación neuronal, la leucemia linfoblástica aguda (ALL) , T leucemia linfocítica aguda/linfoma (ALL), leucemia mielógena aguda, myel aguda oid leucemia (AML), de células B leucemia linfocítica crónica (B-CLL), de células B prolinfocítica linfoma, linfoma de Burkitt (BL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML-BP), leucemia mielóide crónica (CML), linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas (HCL), el linfoma de Hodgkin (HL), linfoma de células B grandes intravascular, granulomatosis linfomatoide, linfoma linfoplasmacítico, linfoma MALT, linfoma de células del manto, mieloma múltiple (MM) , natural killer leucemia de células, linfoma de células B nodal marginal, linfoma no hodgkiniano (NHL), leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma primario derrame, leucemia pro-linfocítica, leucemia promielocítica, linfoma linfocítico pequeño, linfoma esplénico de la zona marginal, T linfoma células beta (TCL), enfermedad de cadena pesada, gammapatía monoclonal, enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal, síndromes mielodisplásicos (MDS), mieloma múltiple latente, y macroglobulinemia de Waldenstrom.

45 En ciertas realizaciones, los polipéptidos y proteínas de la presente invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se utilizan tanto para el diagnóstico y el tratamiento, o para el diagnóstico solo.

50 Los polipéptidos de la presente invención tienen usos como materiales de inmunización para provocar respuestas inmunes contra epítomos específicos basados en la presencia de una alteración (s) en una región (s) epítomo seleccionado. Un polipéptido de la presente invención puede usarse como un material de inmunización para la administración a un mamífero y/o utilizado en una pantalla de visualización para generar un dominio de inmunoglobulina que reconoce una toxina Shiga.

55 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos de proteínas selectivamente citotóxicas que comprenden regiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas derivadas de subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga y regiones de unión capaces de unirse a biomoléculas diana extracelulares acopladas físicamente a tipos de células específicas.

EJEMPLOS

60 Los siguientes ejemplos demuestran ciertas realizaciones de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no tienen la intención, ni deben ser interpretados, como totalmente definitivos en cuanto a las condiciones y el alcance de esta invención, que se define en las reivindicaciones. Los experimentos en los siguientes ejemplos se llevaron a cabo utilizando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa lo contrario en detalle.

65 Con el fin de mejorar las regiones de polipéptidos de la toxina derivada de Shiga para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico en mamíferos, predijo epítomos de células B a lo largo de regiones enteras toxina efectoras fueron

interrumpidas sistemáticamente con el objetivo de amortiguación de mamífero de células B respuestas inmunitarias mediadas. Se analizaron las secuencias de aminoácidos que representa un Subunidades de múltiples toxinas Shiga para identificar epítomos antigénicos y/o inmunogénicos putativos. Herramientas computacionales se utilizaron para predecir de células B y de células T epítomos, incluyendo consideraciones de datos estructurales de base de datos de proteínas disponibles públicamente. Predicciones epítomo fueron validadas empíricamente. Varios polipéptidos toxina efectoras-de inmunizado Shiga se probaron experimentalmente para la pérdida de los epítomos presentes en la toxina Shiga nativo subunidades y la retención de las funciones efectoras de la toxina de Shiga. Las actividades biológicas de los polipéptidos ejemplares de-inmunizado toxina Shiga efectoras como componentes de varias proteínas citotóxicas fueron comparados con proteínas citotóxicas que comprenden polipéptidos de la toxina Shiga efectoras inmunizados la no-de, denominan en este documento como "de tipo salvaje" o "WT".

Los siguientes ejemplos de polipéptidos de la toxina efectoras de-inmunizado Shiga demuestran la retención de las funciones efectoras de la toxina Shiga como componentes de varias proteínas citotóxicas. Las proteínas citotóxicas ejemplares obligados a dirigirse a biomoléculas expresadas por tipos de células específicas y entraron en las células diana. Las proteínas citotóxicas internalizados encaminan eficazmente sus regiones de-inmunizado toxina Shiga efectoras al citosol para inactivar los ribosomas y posteriormente causaron la muerte apoptótica de las células diana similares a proteínas citotóxicas que comprenden de tipo salvaje regiones toxina Shiga efectoras. Además, los siguientes ejemplos demuestran que múltiples alteraciones de epítomos se pueden combinar en polipéptidos región efectora de la toxina Shiga para reducir la antigenicidad en general y/o inmunogenicidad de una proteína citotóxica de la presente invención al tiempo que conserva potente citotoxicidad.

Ejemplo 1. Predicción de epítomos inmunogénicos y antigénicos en subunidades A de toxina Shiga

Los sitios antigénicos y/o inmunogénicos dentro de las subunidades A de toxinas Shiga nunca habían sido asignados sistemáticamente. Se utilizaron procedimientos computacionales para predecir epítomos antigénicos y/o inmunogénicos en varias subunidades A de toxina Shiga. Se predijeron in silico epítomos de células B y epítomos de células T CD4+ con potencial para provocar respuestas en sistemas inmunes de mamíferos.

Se predijeron epítomos de células B lineales para la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A; SEQ ID NO: 1) a partir de la secuencia de polipéptido y datos estructurales 3D de la cadena A de toxina similar a Shiga (PDB ID: 1DM0_A) por ProImmune Inc. (Sarasota, FL, EE.UU.) utilizando su sistema REVEAL®.

En paralelo, se predijeron los epítomos de células B a partir de las secuencias de aminoácidos de las subunidades A de la toxina Shiga (StxA; SEQ ID NO: 2), toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A; SEQ ID NO: 1) y toxina similar a Shiga 2 (Stx2A; SEQ ID NO: 3) utilizando el servidor web BcePred (Saha S, Raghava G, Lecture Notes in Comput Sci 3239: 197-204 (2004)), la predicción de epítomos lineales BepiPred (Larsen J et al., Immunome Res 2: 2 (2006)) y predicción de epítomos de anticuerpo ElliPro (Haste Andersen P et al, Protein Sci 15: 2558-67 (2006); Ponomarenko J, Bourne P, BMC Struct Biol 7: 64 (2007)). Los diversos procedimientos computacionales revelaron predicciones similares para las regiones de epítomo de células B en las tres subunidades A de toxina Shiga prototípicas (Tablas 1-3).

Tabla 1. Predicciones de epítomos de células B para la subunidad A nativa madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO 1)

posiciones de aminoácidos posicionadas de forma nativa			
REVEAL	BcePred	Bepipred	ElliPro
	29-35	28-34	27-37
42-48	39-46	43-47	
58-66	55-61	56-64	57-66
96-103	105-111	100-115	96-110
144-151	141-147	147-151	144-153
183-189	181-187	183-185	180-190
		211-219	
243-251			243-257
257-268	261-267	254-268	
289-293	285-291		262-293

Tabla 2. Predicciones de epítomos de células B para la subunidad A nativa madura de la toxina Shiga (SEQ ID NO 2)

posiciones de aminoácidos posicionadas de forma nativa			
REVEAL	BcePred	Bepipred	ElliPro
	29-35	28-34	27-37
42-48	39-46	43-47	
58-66	55-61	56-64	57-66
96-103	105-111	100-115	96-110

144-151	141-147	147-151	144-153
183-189	181-187	183-185	180-190
		211-219	
243-251			243-257
257-268	261-267	254-268	
289-293	285-291		262-293

Tabla 3. Predicciones de epítomos de células B para la subunidad A nativa madura de la toxina similar a Shiga 2 (SEQ ID NO 3)

posiciones de aminoácidos posicionadas de forma nativa		
BcePred	Bepipred	ElliPro
3-11	8-14	
29-35	28-36	26-37
		42-48
	57-62	56-66
108-115	109-115	96-110
141-156		140-153
	179-188	180-191
	210-218	210-217
240-257	244-258	241-255
		262-278
		281-297

5 Los estudios de alineación de secuencias anterior predijeron regiones epítomo inmunitario en toxina Shiga A Subunidades que podrían ser antigénico y/o inmunogénico basado en un epítomo en la ricina unida por un anticuerpo neutralizante (Lebeda F, Olson M, Int J Biol Macromol 24: 19- 26 (1999); Zemla A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13 (2008)). Se predijo que podría haber un epítomo inmunogénico conservado en stxA alrededor de los residuos 90-107 y en Stx2A alrededor de los residuos 112-129 (Zemla A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13 (2008)). Sin embargo, esta predicción era la verdad es poco fiable debido a las diferencias fundamentales entre la toxina ricina planta y las toxinas Shiga bacterianas, tales como, por ejemplo, la gran cantidad de variabilidad de secuencia entre las toxinas ricina y Shiga, la falta de una hélice alfa N-terminal en el a subunidades de toxinas Shiga, y la región predicha es más corto y menos disolvente expuestos en toxina Shigas en comparación con ricina ((Fraser M y otros, Nature Struct Biol. 1: 59 (1994); Lebeda F, Olson M, Int J Biol Macromol 24: 19-26 (1999); Zemla A, Ecale Zhou C, Bioinform Biol Insights 2: 5-13 (2008)).

20 La base de datos de Immune Epitope (IEDB) elaborada por los Institutos Nacionales de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los EE.UU. (NIAID) se dice que proporciona todos los epítomos de células T de banda caracterizados experimentalmente de toxinas Shiga. Actualmente, la IEDB proporciona solamente un único epítomo para sólo una única subunidad A de la toxina Shiga (Stx2dA): IEDB número de identificación de 110493, un epítomo de células B discontinuo determinado experimentalmente que comprende los aminoácidos 42-49, 96-100 y 245-260 (Smith M et al, Infect Immun. 77: 2730-40 (2009)).

25 Las nueve regiones de epítomo de células B predichas identificadas por más de un procedimiento en SLT-1A (Tabla 4) se alteraron en los siguientes Ejemplos.

Tabla 4. Nueve posibles regiones de epítomos de células B ompartidas por subunidades A de la toxina Shiga prototípicas

Región de epítomo	posiciones de aminoácidos posicionadas de forma nativa		
	SLT-1A	StxA	SLT-2A
			3-14
1	27-37	27-37	26-37
2	39-48	39-48	42-49
3	55-66	55-66	56-66
4	96-115	96-115	96-115
5	141-153	141-153	140-156
6	180-190	180-190	179-191
			210-218
7	243-257	243-257	240-260
8	254-268	254-268	262-278
9	285-293	285-293	281-297

Además, las subunidades A de la toxina Shiga se analizaron utilizando el servidor web Epitopia para predecir epítomos de células B y los residuos inmunogénicos (Rubinstein N et al, BMC Bioinformatics 10: 287 (2009)). Epitopia se utilizó para identificar regiones de residuos de aminoácidos lineales prevé que sea inmunogénica en SLT-1A basado en una puntuación Epitopia de 4 o 5 ("alto") para la mayoría de los residuos de aminoácidos en un tramo de residuos de aminoácidos lineal. El análisis Epitopia predijo una región inmunogénica se produce a partir de residuos de aminoácidos 1 a 15 en SLT-1A (designado como Epítomo Región 0 abajo, véase la Tabla 5, infra). Basándose en el análisis Epitopia, la región epítomo inmunogénico 2 en SLT-1A (véase la Tabla 4) podría incluir la posición 49. En base al análisis Epitopia, la región epítomo inmunogénico 3 en SLT-1A (véase la Tabla 4) podría incluir la posición 53 y se extiende a alrededor de la posición 62-66 (designado como Epítomo Región 3 * a continuación, véase la Tabla 5, infra), la región del epítomo 4 en SLT-1A (véase la Tabla 4) podría incluir la posición 94 (designado como Epítomo Región 4 * a continuación, ver Tabla 5, infra), y el epítomo región 6 en SLT-1A (véase la Tabla 4) podrían comenzar en la posición 179 y se extienden a alrededor de la posición 188-190 (designado como epítomo región 6 * a continuación, véase la Tabla 5, infra). Tenga en cuenta las regiones de epítomo de células B con estrellas abarcan todas completamente su respectiva zona de solapamiento con el mismo identificador numérico.

Estas diez regiones de epítomo (# 0-9) se compararon para superposición con epítomos de células T CD4+ predichos. Los epítomos de células T se predijeron para la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) mediante el ensayo de células T del Sistema de Inmunogenicidad REVEAL™ realizado por ProlImmune Inc. (Sarasota, FL, US). Este ensayo utiliza múltiples secuencias de péptidos que se solapan de la proteína objeto para analizar la obtención de una respuesta inmunitaria por las células T CD4+ a partir de muestras de células de donantes sanos agotadas de células T CD8+. De las 13 regiones de epítomo de células B predichas, todas ellas se solaparon con al menos un epítomo de células T CD4+ predicho (Tabla 5). Todas las regiones de epítomo de células B predichas de la Tabla 5 se alteraron o se eliminaron de forma individual o en combinación en los siguientes Ejemplos.

Tabla 5. Regiones de epítomo de células B predichas con epítomos de células T CD4+ solapantes predichos

Región de epítomo	posiciones de aminoácidos posicionados de forma nativa	
	región de epítomo de células B	Epítomo de células T (Proimmune)
0	1-15	4-33
1	27-37	4-33; 34-78
2	39-48	34-78
3*	53-66	34-78
3	55-66	77-103
4*	94-115	77-103
4	96-115	77-103
5	141-153	128-168
6*	179-190	160-183
6	180-190	160-183
7	243-257	236-258
8	254-268	236-258
9	285-293	274-293

Ejemplo 2. Desinmunización de polipéptidos efectores de toxina Shiga

Las delecciones y/o sustituciones de aminoácidos se realizaron en los posibles epítomos de células B y de células T de polipéptidos efectores de la toxina Shiga derivados de la subunidad A de toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A). Además de las mutaciones puntuales descritas que alteraron los epítomos predichos, algunas construcciones comprendían una o más mutaciones puntuales que no tenían ningún efecto aparente sobre la actividad enzimática o citotoxicidad efectora de la toxina Shiga, tal como, por ejemplo, R223A en SLT-1A, C242S en SLT-1A y/o C261S en SLT-1A.

En este ejemplo, una región de polipéptido de la toxina Shiga efector se deriva de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A). Un polinucleótido que codifica los aminoácidos 1-251 de SLT-1A se utilizó como una plantilla para crear diversos polinucleótidos que codifican varios polipéptidos de la toxina Shiga efectoras con una o más alteraciones de un epítomo (s) de células B predicho. Polipéptidos de la toxina Shiga efectoras que comprenden una o más alteraciones de epítomo se expresaron a partir de estos polinucleótidos para explorar que las alteraciones pueden más eficaz de-inmunizar diversos polipéptidos toxina Shiga efectoras en el contexto de una proteína citotóxica de la presente invención.

El truncamiento del carboxi-terminal de SLT-1A a los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1 eliminación de las dos últimas regiones de epítomo de células B (Tabla 5, # 8 y # 9), los dos últimos CD4 + T- regiones de epítomo de células (Tabla 5, # 8 y # 9), y la más alta puntuación discontinua epítomo de células B predicho por ElliPro (289-293). Además, el truncamiento en la posición 251 puede alterar la séptima región epítomo que comprende putativo de células B y epítomos de células T (Tabla 5).

Las sustituciones de aminoácidos seleccionada racionalmente (ver Tabla 6) fueron creados en el polipéptido de la toxina Shiga efector truncada que comprende los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. En epítipo región # 0 (véase la Tabla 5), se hicieron al menos siete sustituciones de aminoácidos diferentes y probados (véase la Tabla 6). En epítipo región # 0, la lisina nativa situado en la posición 1 en las madurar un subunidades de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a metionina (K1M)). En epítipo región # 0, la treonina nativa situado en la posición 4 en los madurar un subunidades de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (T4I). En epítipo región # 0, la serina nativa situado en la posición 8 en los madurar un subunidades de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (S8I). En la región de epítipo # 0, la treonina nativa situado en la posición 9 en los madurar un subunidades de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (T9i) y para valina (T9V). En epítipo región # 0, la lisina nativa situado en la posición 11 en los madurar un subunidades de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (K11A) y para histidina (K11H). Los siguientes cinco residuos de aminoácido mutadas en la región de epítipo # 0: K1, T4, S8, T9, y K11, se predijo por el servidor web Epitopia ser expuestos al disolvente.

En la región de epítipo # 1 (véase la Tabla 5), la serina nativa situado en la posición 33 en los madurar un subunidades de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) era mutado a isoleucina (S33I).

En la región de epítipo # 2 (véase la Tabla 5), la serina nativa situado en la posición 45 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) se mutó a la valina (S45V) y a isoleucina (S45i). En epítipo región # 2 (véase la Tabla 5), el aspartato de forma nativa situado en la posición 47 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a glicina (D47G). En epítipo región # 2 (véase la Tabla 5), la asparagina nativa situado en la posición 48 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) se mutó a la valina (N48V) y a la fenilalanina (N48F).

En epítipo región # 3 * (véase la Tabla 5), el aspartato de forma nativa situado en la posición 53 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (D53A), glicina (D53G), y asparagina (D53N). El residuo D53 fue predicho por el servidor web Epitopia ser expuestos al disolvente y tienen un valor de escala inmunogenicidad de 5 o "alto". En la región de epítipo # 3 y # 3 * (véase la Tabla 5), la arginina nativa situado en la posición 55 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (R55A), a la valina (R55V), y para leucina (R55L). En la región de epítipo # 3 y # 3 *, el aspartato de forma nativa situado en la posición 58 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (D58A), valina (D58V), y para la fenilalanina (D58F). En la región de epítipo # 3 y # 3 *, la prolina de forma nativa situado en la posición 59 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (P59A). En la región de epítipo # 3 y # 3 *, el glutamato de forma nativa situado en la posición 60 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (E60I), a treonina (E60T), y para la arginina (E60R). En la región de epítipo # 3 y # 3 *, el glutamato de forma nativa situado en la posición 61 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (E61A), valina (E61V), y leucina (E61L). En la región de epítipo # 3 y # 3 *, la glicina nativa situado en la posición 62 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (G62A).

En epítipo región # 4 * (véase la Tabla 5), el aspartato de forma nativa situado en la posición 94 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (D94A). Este residuo D94 fue predicho por el servidor web Epitopia ser expuestos al disolvente y tienen un valor de escala inmunogenicidad de 5 o "alto". En la región de epítipo # 4 y # 4 * (véase la Tabla 5), la serina nativa situado en la posición 96 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (S96I). En la región de epítipo # 4 y # 4 * (véase la Tabla 5), la serina nativa situado en la posición 109 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a la valina (S109V). En la región de epítipo # 4 y # 4 * (véase la Tabla 5), la glicina de forma nativa situado en la posición 110 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (G110A). En la región de epítipo # 4 y # 4 * (véase la Tabla 5), la serina nativa situado en la posición 112 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a la valina (S112V).

En la región de epítipo # 5 (véase la Tabla 5), la glicina de forma nativa situado en la posición 147 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) era mutado a alanina (G147A).

En la región de epítipo 6 * (véase la Tabla 5), la arginina nativa situado en la posición 179 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) era mutado a alanina (R179A). Este residuo R179 fue predicho por el servidor web Epitopia de estar expuestos y tienen un valor inmunogenicidad de 5 o "alto". En la región de epítipo # 6 y # 6 * (véase la Tabla 5), la treonina nativa situado en la posición 180 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a glicina

5 (T180G). En la región de epítipo # 6 y # 6 * (véase la Tabla 5), la treonina nativa situado en la posición 181 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (T181I). En la región de epítipo # 6 y # 6 * (véase la Tabla 5), el aspartato de forma nativa situado en la posición 183 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (D183A) y glicina (D183G). En la región de epítipo # 6 y # 6 *, la aspartato nativa situado en la posición 184 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (D184A) o fenilalanina (D184F). En la región de epítipo # 6 y # 6 * (véase la Tabla 5), la leucina nativa situado en la posición 185 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a la valina (L185V). En la región de epítipo # 6 y # 6 *, la serina nativa situado en la posición 186 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (S186A) y fenilalanina (S186F). En la región de epítipo # 6 y # 6 *, la glicina nativa situado en la posición 187 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (G187A). En la región de epítipo # 6 y # 6 *, la arginina nativa situado en la posición 188 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (R188A) y leucina (R188L). En la región de epítipo # 6 y # 6 *, la serina nativa situado en la posición 189 en el maduro subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (S189A).

20 En la región de epítipo No. 7 (véase la Tabla 5), la arginina situada nativa en la posición 248 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (R248A). En la región de epítipo No. 7, la arginina situada nativa en la posición 251 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (R251A).

25 La leucina situada de forma nativa en la posición 49 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (L49A). Este residuo L49 se predijo por el servidor web Epitopia que se exponía al disolvente y tenía un valor de inmunogenicidad de 4. La arginina situada de forma nativa en la posición 205 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutó a alanina (R205A). Este residuo R205 se predijo por el servidor web Epitopia que se exponía al disolvente y tenía un valor inmunogenicidad de 5 o "elevado".

30

Tabla 6. Sustituciones de aminoácidos en polipéptidos efectores de la toxina Shiga de ejemplo

Región de epítipo alterada	posiciones de aminoácidos situadas de forma nativa		
	sustitución	Región de epítipo de células B	Región de epítipo de células T
0	K1M	1-15	
0	T4I	1-15	4-33
0	S8I	1-15	4-33
0	T9V	1-15	4-33
0	T9I	1-15	4-33
0	K11A	1-15	4-33
0	K11H	1-15	4-33
1	S33I	27-37	4-33, 34-78
2	S45V	39-48	34-78
2	S45I	39-48	34-78
2	D47G	39-48	34-78
2	N48V	39-48	34-78
2	N48F	39-48	34-78
-	L49A	residuo inmunogénico	34-78
3*	D53A	53-66	34-78
3*	D53G	53-66	34-78
3*	D53N	53-66	34-78
3 y 3*	R55A	55-66	34-78
3 y 3*	R55V	55-66	34-78
3 y 3*	R55L	55-66	34-78
3 y 3*	I57F	55-66	34-78
3 y 3*	D58A	55-66	34-78
3 y 3*	D58F	55-66	34-78
3 y 3*	P59A	55-66	34-78
3 y 3*	P59F	55-66	34-78
3 y 3*	E60I	55-66	34-78
3 y 3*	E60T	55-66	34-78
3 y 3*	E60R	55-66	34-78
3 y 3*	E61A	55-66	34-78

3 y 3*	E61V	55-66	34-78
3 y 3*	E61L	55-66	34-78
3 y 3*	G62A	55-66	34-78
4*	D94A	94-115	77-103
4 y 4*	S96I	94-115	77-103
4 y 4*	S109V	94-115	
4 y 4*	G110A	94-115	
4 y 4*	S112V	94-115	
5	G147A	141-153	128-168
6*	R179A	179-190	160-183
6 y 6*	T180G	180-190	160-183
6 y 6*	T181I	180-190	160-183
6 y 6*	D183A	180-190	160-183
6 y 6*	D183G	180-190	160-183
6 y 6*	D184A	180-190	
6 y 6*	D184F	180-190	
6 y 6*	L185V	180-190	
6 y 6*	S186A	180-190	
6 y 6*	S186F	180-190	
6 y 6*	G187A	180-190	
6 y 6*	R188A	180-190	
6 y 6*	R188L	180-190	
6 y 6*	S189A	180-190	
-	R205A	residuo inmunogénico	
7	R248A	243-257	236-258
7	R251A	243-257	236-258

La sustitución de aminoácidos que comprende los polipéptidos efectores de toxina Shiga se ensayaron como componentes de posibles proteínas citotóxicas con regiones de unión de reconocimiento celular. Las proteínas citotóxicas comprendían una región de unión de tipo inmunoglobulina y la región efectora de la toxina Shiga unidas entre sí para formar una proteína de fusión. Estas posibles proteínas de fusión citotóxicas fueron producidas mediante la expresión a partir de polinucleótidos que las codifican usando un sistema bacteriano conocido en la técnica.

Ejemplo 3. Polipéptidos efectores de la toxina Shiga desimmunizados empíricamente ensayados para la retención de uno o más de funciones efectoras de la toxina Shiga

Varios polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desimmunizados se ensayaron empíricamente para la retención de la actividad enzimática y la citotoxicidad.

La retención de la actividad enzimática de los polipéptidos efectores de la toxina después de la desimmunización se ensayó usando un ensayo de inhibición de ribosomas en el contexto del polipéptido efector de la toxina Shiga como un componente de una proteína citotóxica. En ciertos experimentos, la secuencia codificante de longitud completa de la proteína citotóxica de este ejemplo empezó o terminó con un polinucleótido que codifica un Strep-tag® II para facilitar la detección y purificación.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de las proteínas citotóxicas desimmunizadas se determinaron usando un ensayo de traducción de proteínas in vitro libre de células usando el kit de transcripción/traducción acoplado TNT® Quick (L1170 Promega Madison, WI, US). El kit incluye ADN de control luciferasa T7 (L4821 Promega Madison, WI, EE.UU.) y mezcla madre TNT® Quick. La reacción actividad de ribosomas se preparó según las instrucciones del fabricante. Una serie de diluciones de 10 veces de la proteína comprende una región de polipéptido efector de la toxina Shiga mutada a ensayar se preparó en un tampón apropiado y se creó una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución. Cada muestra en la serie de dilución se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control de luciferasa de T7. Las muestras de ensayo se incubaron durante 1,5 horas a 30 grados Celsius (° C). Después de la incubación, se añadió el reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE.UU.) a todas las muestras de prueba y se midió la cantidad de traducción de la proteína luciferasa mediante luminiscencia según las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición de la traducción se determinó por análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó el valor de la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC₅₀) para cada muestra usando la función de software Prism de log (inhibidor) vs. respuesta (tres parámetros) $[Y = \text{Inferior} + ((\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{-(X - \text{Log IC}_{50})}))]$ bajo el título de dosis-respuesta-inhibición. Se calcularon las IC₅₀ para cada proteína que comprende una región de polipéptido efector de la toxina Shiga desimmunizado y una proteína de control que comprende una región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje sin alteraciones de epítotos internos se calcularon.

Las regiones polipeptídicas efectoras de la toxina Shiga de ejemplo que mostraron inhibición de ribosoma se indican en la Tabla 7. Como se informa en la Tabla 7, una construcción que comprende una sustitución que muestra una IC₅₀ dentro de 10 veces de una construcción de control SLT-1A de tipo salvaje se considera que muestra actividad de inhibición de ribosoma comparable con la de tipo salvaje; una construcción que presenta una IC₅₀ entre 10 veces y 100 veces de un control SLT-1A de tipo salvaje se considera que presenta actividad atenuada en comparación con la de tipo salvaje; y una construcción que presenta una IC₅₀ mayor de 100 veces la de un control SLT-1A de tipo salvaje se considera muy afectado o inactivo (muy afectado/inactivo).

Tabla 7. Actividades de inhibición de ribosomas de polipéptidos efectoras de la toxina Shiga de ejemplo

Región de epíteto	Sustitución(es)	Inhibición de ribosoma in vitro (IC ₅₀)
0	K1M, K11A	Comparable con tipo salvaje
0	S8I	Comparable con tipo salvaje
0	T9I	Comparable con tipo salvaje
1	S33I	Comparable con tipo salvaje
2	S45I	Comparable con tipo salvaje
3*	D53A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	R55A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	D58A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	D58F	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	P59A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	E60I	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	E60R	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	E61A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	G62A	Comparable con tipo salvaje
4 & 4*	D94A, S96I	Comparable con tipo salvaje
6*	R179A	Muy afectado o inactivo
6 & 6*	D183A	Comparable con tipo salvaje
6 & 6*	D184A	Comparable con tipo salvaje
6 & 6*	D184F	Comparable con tipo salvaje
6 & 6*	R188A	Comparable con tipo salvaje
6 & 6*	D183A, D184A, R188A	Comparable con tipo salvaje
-	R205A	Comparable con tipo salvaje

La retención de la actividad citotóxica de varios polipéptidos efectoras de la toxina Shiga de ejemplo después de desinmunización se ensayó usando un ensayo de eliminación de células diana en el contexto del polipéptido efector de la toxina Shiga como un componente de una proteína citotóxica con una región de unión capaz de unirse de manera específica y con alta afinidad a una biomolécula diana extracelular expresada y físicamente acoplada a la superficie celular de las células diana (es decir, "células que expresan diana" o "células positivas de biomolécula diana"). Los niveles de citotoxicidad de las proteínas citotóxicas desinmunizadas se determinaron utilizando células que expresan diana en comparación con células que no expresan una biomolécula diana de región de unión de la proteína citotóxica.

Las células que expresan diana se sembraron (2×10^3 células por pocillo para células adherentes, se sembraron el día antes de la adición de proteínas o $7,5 \times 10^3$ células por pocillo para las células en suspensión, se sembraron el mismo día que la adición de proteína) en 20 μ l de medio de cultivo celular en placas de 384 pocillos. Una serie de diluciones de 10 veces de cada proteína que comprende una región de polipéptido efector de toxina Shiga mutada a ensayar se preparó en un tampón apropiado, y se añadieron 5 μ l de las diluciones o tampón de control a las células. Los pocillos de control que contienen sólo medio se utilizaron para la corrección de la línea base. Las muestras de células se incubaron con las proteínas o simplemente tampón durante 3 días a 37 ° C y en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% (CO₂). La supervivencia de las células o porcentaje de viabilidad total se determinó utilizando una lectura luminiscente utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7573 Promega Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación: $(\text{RLU de ensayo} - \text{RLU de medio promedio}) / (\text{RLU de células promedio} - \text{RLU de medio promedio}) \times 100$. La concentración de polipéptido logarítmica frente a porcentaje de viabilidad se representó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.) y se utilizó el análisis de log (inhibidor) versus respuesta (3 parámetros) para determinar el valor de concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para las proteínas ensayadas. Se calcularon las CD₅₀ para cada proteína que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado y proteína de control de tipo salvaje sin alteraciones de epítomos internos.

La citotoxicidad de las regiones de polipéptidos efectoras de la toxina Shiga de ejemplo se indica en la Tabla 8. Como se informa en la Tabla 8, una construcción que comprende una sustitución que muestra una CD₅₀ dentro de 10 veces

de una construcción de control SLT-1A de tipo salvaje se considera que muestra citotoxicidad comparable con la de tipo salvaje; una construcción que presenta una CD_{50} entre 10 veces y 100 veces de un control SLT-1A de tipo salvaje se considera que presenta citotoxicidad atenuada en comparación con la de tipo salvaje; y una construcción que presenta una CD_{50} mayor de 100 veces la de un control SLT-1A de tipo salvaje se considera muy afectado o inactivo.

5

Tabla 8. Actividades citotóxicas de polipéptidos efectores de la toxina Shiga de ejemplo

Región de epíteto	Sustitución(es)	Citotoxicidad (CD_{50})
0	K1M, K11A	Comparable con tipo salvaje
0	S8I	Comparable con tipo salvaje
0	T9I	Atenuada
1	S33I	Comparable con tipo salvaje
2	S45I	Comparable con tipo salvaje
3*	D53A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	R55A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	D58A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	D58F	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	P59A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	E60I	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	E60R	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	E61A	Comparable con tipo salvaje
3 & 3*	G62A	Comparable con tipo salvaje
4 & 4*	D94A, S96I	Atenuada
6*	R179A	Muy afectado o inactivo
6 & 6*	D183A	Comparable con tipo salvaje
6 & 6*	D184A	Comparable con tipo salvaje
6 & 6*	D184F	Atenuada
6 & 6*	R188A	Comparable con tipo salvaje
6 & 6*	D183A, D184A, R188A	Comparable con tipo salvaje
-	R205A	Comparable con tipo salvaje

El término "éxito" se usa para significar una o más sustituciones de residuos de aminoácidos en una región de epítipo predicho que daba lugar a un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga que retenía una o más funciones efectoras de la toxina Shiga. Tres sustituciones (D183A, D184A y R188A), que tuvieron éxito individualmente en la misma región de epítipo (# 6 y 6 *) fueron combinadas para generar un polipéptido efector de la toxina Shiga desimmunizado (D183A/D184A/R188A) que retenía la función efectora de la toxina Shiga comparable con el de tipo salvaje (Tablas 7 y 8). Estos resultados sugieren que algunas sustituciones de aminoácidos exitosas en la misma región de epítipo de un polipéptido efector de toxina Shiga se pueden combinar para crear alteraciones de epítipo con una mayor alteración general de epítipo al tiempo que se conservan niveles significativos de una o más funciones efectoras de la toxina Shiga. Del mismo modo, las dos regiones de epítipo # 0 y # 4 y 4* toleraron con éxito múltiples sustituciones de aminoácidos dentro de sus respectivas regiones (Tablas 7 y 8: K1M/K11A y D94A/S96I). Se refuerza la idea de que diversas sustituciones ejemplares en la misma región de epítipo se pueden combinar para crear alteraciones de epítipo con una mayor alteración general de epítipo al tiempo que se conservan niveles significativos de una o más funciones efectoras de la toxina Shiga.

Además, otros polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga se ensayaron para funciones efectoras de la toxina Shiga y la alteración de epítipo utilizando los procedimientos que se describen en los Ejemplos en este documento, donde los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga comprendían múltiples sustituciones de aminoácidos dentro de una única región de epítipo de células B predicha. Las regiones ensayadas fueron las siguientes regiones posicionadas de forma nativa presentes en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2): 4-12, 43-52, 53-61, 104-112, y 180-188. Estos construcciones con multisustitución de una única región se crearon en varias combinaciones en el contexto de una proteína citotóxica que comprende una región efectora de toxina Shiga que comprende los residuos 1-251 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1). Estas construcciones retenían la inhibición de ribosomas comparable a una construcción efectora de SLT-1A de tipo salvaje y eran citotóxicas selectivamente a células diana. Estas construcciones comprendían una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos en varias combinaciones con otras sustituciones de aminoácidos en una sola región: región 4-12: T4I, T9V y K11H; región 43-52: S45V, D47G, N48V, N48F y L49A; región 53-61: D53G, D53N, R55V, R55L, D58V, E60T, E61V y E61L; región 104-112: S109V, G110A, y S112V; región 180-188: T180G, T181I, D183G, L185V, S186F y R188L. Además, el análisis Western de estas construcciones demostró una reducción o supresión del reconocimiento de cada construcción por uno o más anticuerpos que pueden reconocer SLT-1A de tipo salvaje (mAb1, pAb1 y pAb2 descritos en el Ejemplo 4).

Además, la región de epítipo nº 7 se altera por la sustitución R248A o R251 sin ningún efecto significativo sobre la actividad de inhibición de ribosomas o citotoxicidad. R248A o R251A pueden introducirse con éxito en los polipéptidos

de la región efectora de la toxina Shiga de ejemplo descritos anteriormente sin alterar la inhibición de ribosomas o citotoxicidad.

Las alteraciones de epítomos individuales mencionadas anteriormente, así como nuevas alteraciones se combinaron para crear varias combinaciones de polipéptidos efectores de toxina Shiga (Tabla 9) que comprendían las alteraciones de dos o más regiones de epítomos, y a continuación se examinaron empíricamente para la retención de funciones efectoras de toxina Shiga, tal como se describe en este ejemplo. La tabla 9 enumera las actividades exhibidas por construcciones con combinaciones de sustituciones de aminoácidos, dentro de una sola región de epítomo o en un máximo de cinco diferentes regiones de epítomos, usando los términos descritos anteriormente.

Tabla 9. Combinaciones de sustitución de aminoácidos de múltiples regiones de epítomo en polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizada y proteínas citotóxicas

Regiones de epítomos alteradas	Sustituciones	Inhibición de ribosomas	Citotoxicidad
3/3*, 4/4*	E60I, G110A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
3/3*, 5	E60I, G147A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
2, 6/6*	S45I, R188A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
1, 4/4*, 5	S33I, G110A, G147A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
2, 4/4*, 5	S45I, G110A, G147A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
3/3*, 4/*4, 5	D58A, G110A, G147A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
3/3*, 4/*4, 5	E60I, G110A, G147A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
2, 3/3*, 4/*4, 5	S45I, D58A, E60I, G110A, G147A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
2, 3/3*, 4/*4, 5	S45I, D58A, E60I, G62A, G110A, G147A	Comparable con tipo salvaje	atenuado
2, 4/4*, 5, 6/6*	S45I, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S186A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, G187A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, R188A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S189A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, S186A, R188A	Comparable con tipo salvaje	atenuado
3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	D58A, G110A, G147A, G187A, R188A	Comparable con tipo salvaje	atenuado
1,2, 3/3*, 4/*4, 5	S33I, S45I, D58A, G110A, G147A	Comparable con tipo salvaje	Comparable con tipo salvaje
2, 3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	S45I, D58A, E60I, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A	Comparable con tipo salvaje	atenuado
2, 3/3*, 4/*4, 5, 6/6*	S45I, D58A, E60I, G62A, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A	Comparable con tipo salvaje	atenuado

Estos resultados sugieren generalmente que la mayoría, si no todas, las sustituciones de aminoácidos con éxito en una región de epítomo de un polipéptido efector de toxina Shiga, lo que significa cualquier sustitución empíricamente demostrada que retiene una función efectora de toxina Shiga y predicha para alterar un epítomo, pueden combinarse con la mayoría, si no todas, otras sustituciones de aminoácidos con éxito en una región de epítomo diferente para formar un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado con múltiples regiones de epítomo alteradas, al tiempo que conserva al menos una función efectora de la toxina Shiga.

Ejemplo 4. Polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados que se prueban empíricamente para la alteración de epítomo o epítomos antigénicos y/o inmunogénicos

Se realizaron pruebas experimentales para confirmar la alteración de epítomos de células B en base a epítomos empíricamente verificables reconocidos por anticuerpos conocidos. Se realizaron análisis Western para determinar las alteraciones de epítomos en condiciones de desnaturalización. Se realizaron análisis de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar las alteraciones de epítomos bajo más condiciones de plegamiento de proteína nativa (es decir, condiciones no desnaturalizantes).

Se cargaron proteínas citotóxicas que comprenden Streptag® II y regiones polipeptídicas efectoras de toxina Shiga de tipo salvaje o regiones polipeptídicas efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas en cantidades iguales para replicar geles de poliacrilamida de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 4-20% (Lonza, Basilea, CH) y se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Los geles resultantes se analizaron ya sea por tinción con Coomassie o transferencia a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) utilizando el sistema iBlot® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Las membranas resultantes se probaron en condiciones estándar usando los siguientes anticuerpos: α -NWSHPQFEK policlonal de conejo (SEQ ID NO: 134) (A00626, GenScript, Piscataway, NJ, Estados Unidos) que reconoce el polipéptido NWSHPQFEK (SEQ ID NO: 134), también conocido como Streptag® II, α -stxA monoclonal de ratón (mAb1 anti-SLT-1a o mAb1) (BEI NR-867 BEI Resources, Manassas, VA, EE.UU.), anticuerpo policlonal de conejo α -SLT-1A (Ab1 anti-SLT-1AP o pAb1) (Harlan Laboratories, Inc. Indianapolis, IN, Estados Unidos, la producción de anticuerpos por encargo, generados contra aminoácidos 1-251 de SLT-1A) y anticuerpos policlonales de conejo α -SLT-1A (pAb2 anti-SLT-1A o pAb2) (Genscript, Piscataway, NJ, Estados Unidos, producción de anticuerpos por encargo), que se desarrollaron contra los péptidos RGIDPEEGRFNN (SEQ ID NO: 135) y HGQDSVRVGR (SEQ ID NO: 136). La secuencia del péptido RGIDPEEGRFNN (SEQ ID NO: 135) se extiende por la supuesta región de epítomo de células B # 3 (Tabla 5), y la secuencia de péptido HGQDSVRVGR (SEQ ID NO: 136) está situada en 214-223 en SLT-1A y stxA. Los anticuerpos unidos a la membrana se detectaron utilizando condiciones estándar y, cuando era apropiado, utilizando anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP) (anticuerpo anti-conejo-HRP de cabra o anticuerpo anti-ratón-HRP de cabra, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.). Las figuras 2-5 muestran transferencias Western con los carriles de los geles y/o membranas numeradas y las leyendas de las figuras indican mediante la misma numeración respectiva qué regiones efectoras de toxina Shiga estaban comprendidas dentro de la proteína cargada en cada carril.

La sustitución D58A alteró con éxito uno de los epítomos reconocidos por el anticuerpo policlonal pAb2 α -SLT-1A (Figura 2). Del mismo modo, los mutantes de triple sustitución D58A/G110A/G147A y quintuple sustitución S33I/S45I/D58A/G110A/G147A mostraron una fuerte alteración de al menos uno de los epítomos reconocidos por pAb2 α -SLT-1A (Figura 3; Figura 4) y una alteración parcial de al menos uno de los epítomos reconocidos por pAb1 α -SLT-1A (Figura 3).

Los mutantes de triple sustitución S45I/G110A/G147A y S33I/G110A/G147A mostraron alteración parcial de al menos uno de los epítomos reconocidos por pAb1 α -SLT-1A (Figura 3). El mutante triple S45I/G110A/G147A alteró fuertemente el epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb1 y alteró parcialmente el epítomo reconocido por el anticuerpo policlonal pAb2 α -SLT-1A (Figura 3; Figura 4). El mutante triple D58A/G110A/G147A alteró de manera muy eficaz el epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb1 y al menos uno de los epítomos reconocidos por el anticuerpo policlonal pAb2 α -SLT-1A (Figura 3; Figura 4).

El mutante triple D183A/D184A/R188A mostró una alteración muy eficaz del epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb1 (Figura 5). El mutante cuádruple D58A/G110A/G147A/R188A alteró de manera muy eficaz el epítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal mAb1 y al menos uno de los epítomos reconocidos por el anticuerpo policlonal pAb2 α -SLT-1A y alteró parcialmente al menos uno de los epítomos reconocidos por pAb1 α -SLT-1A (Figura 5).

Es probable que los epítomos alterados en el triple D58A/G110A/G147A, triple S45I/G110A/G147A y cuádruple mutante D58A/G110A/G147A/R188A (uno reconocido por mAb1 y otros reconocidos por pAb2) muy probablemente residen en dos regiones no continuas. Por lo tanto, los mutantes sustitución triple D58A/G110A/G147A, triple S45I/G110A/G147A y cuádruple D58A/G110A/G147A/R188A comprendía cada uno un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizado verificado empíricamente por tener al menos dos epítomos diferentes alterados simultáneamente.

Del mismo modo, es probable que ciertos epítomos dominantes alterados en los mutantes triple D58A/G110A/G147A, triple S45I/G110A/G147A, triple S33I/G110A/G147A, cuádruple D58A/G110A/G147A/R188A y quintuple S33I/S45I/D58A/G110A/G147A (epítomos reconocidos por pAb1 y pAb2) muy probablemente residan en al menos dos regiones no continuas. De este modo, los mutantes triple D58A/G110A/G147A, triple S45I/G110A/G147A, triple S33I/G110A/G147A, cuádruple D58A/G110A/G147A/R188A y quintuple S33I/S45I/D58A/G110A/G147A probablemente comprendían un polipéptido de región efectora de toxina Shiga desinmunizado verificado empíricamente por tener al menos dos epítomos diferentes alterados simultáneamente.

Se utilizó un ELISA estándar para medir la capacidad de mAb1 para reconocer una región efectora de toxina Shiga desinmunizada con múltiples regiones de epítomo alteradas en el contexto de una proteína citotóxica. La proteína citotóxica se unió a la biomolécula diana de su región de unión a scFv. Los pocillos de placas Nunc MaxiSorp® en solución salina tamponada con fosfato (1X PBS) (Hyclone Brand, Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) se

5 recubrieron con proteína diana recombinante humana de la región de unión de la proteína citotóxica. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron con IX PBS 0,05% Tween-20 (PBS-T), y la unión no específica fue bloqueada mediante incubación de los pocillos con leche al 3% en PBS-T durante una hora a temperatura ambiente. Una proteína citotóxica que comprendía Streptag® II y una región efectora de toxina Shiga desimmunizada (D58A/G110A/G147A/R188A) se añadió a los pocillos a una concentración determinada para estar por encima de la constante de disociación de unión (K_D). Como control positivo y referencia para la actividad de tipo salvaje, se añadió una proteína citotóxica que comprendía una región efectora de toxina Shiga de tipo salvaje y un Streptag® II a los pocillos a las mismas concentraciones.

10 Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora para permitir la unión de la proteína citotóxica bajo condiciones no desnaturalizantes. Los pocillos se lavaron con PBS-T y a continuación se incubaron con PBS-T o el anticuerpo monoclonal de ratón mAb1 anti-SLT-1A durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron en PBS-T y a continuación se incubaron con los anticuerpos de detección: anticuerpo conjugado con HRP dirigido a Streptag® II o un anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP. Los pocillos se lavaron en PBS-T y a continuación se incubaron con Pierce TMB Ultra (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, EE.UU.). Las reacciones se detuvieron con ácido clorhídrico 250 mM (HCl). Se detectaron los productos de actividad HRP mediante un dispositivo de lectura de placas que mide la absorbancia (Abs) de luz fijada a la longitud de onda de 450 nanómetros (nm). Los valores de absorbancia medidos se corrigieron por el ruido de fondo sustrayendo los valores de absorbancia para pocillos bloqueados recubiertos incubados con PBS en lugar de cualquier construcción de toxina Shiga.

20 Ambas proteínas citotóxicas se unieron a la biomolécula diana de proteína recombinante humana de la scFv, tal como se mide por altos valores de absorbancia para el anticuerpo Streptag® II (Figura 6). La proteína citotóxica que comprendía la región efectora de la toxina Shiga desimmunizada (D58A/G110A/G147A/R188A) no fue reconocida por el anticuerpo monoclonal mAb1 anti-SLT-1a (Figura 6). La proteína citotóxica de control positivo, que comprendía el polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje se unió por el anticuerpo mAb1 anti-SLT-1a (Figura 6). Estos resultados indican que el epítipo reconocido por mAb1 anti-SLT-1A estaba presente en la región efectora de la toxina Shiga plegada de forma nativa, de tipo salvaje, pero ese epítipo se alteró mediante la combinación de las mutaciones D58A/G110A/G147A/R188A en la región efectora de la toxina Shiga desimmunizada plegada de forma nativa.

30 **Ejemplo 5. Predicción de la alteración de epítipos antigénicos y/o inmunogénicos en polipéptidos efectores de la toxina Shiga**

35 Cada sustitución realizada en el Ejemplo 4 con el objetivo de desimmunizar un polipéptido efector de la toxina Shiga al tiempo que se conservan las funciones efectoras de la toxina Shiga se comprobó la abolición del epítipo de células B predicho en la región de epítipo que comprende la sustitución usando el servidor web BcePred con lo siguiente: lectura de flexibilidad con la configuración predeterminada de hidrofobicidad 2, accesibilidad 2, superficie expuesta 2,4, propensión antigénica 1,8, flexibilidad 1,9, giros 1,9, polaridad 2,3, y combinado 1,9 (Saha S, Raghava g, Lecture Notes in Comput Sci 3239: 197-204 (2004)). La Tabla 10 muestra la sustitución presente en el análisis y el resultado de la predicción de epítipos de células B en la última columna. Es de destacar que las regiones de epítipo # 0 (1-15) y # 7 (243-257) no fueron predichas en SLT-1^a de tipo salvaje por la aproximación de flexibilidad BcePred con la configuración predeterminada. Las sustituciones probadas (véase la Tabla 6) no crearon de novo ningún epítipo de células B predicho mediante el enfoque de flexibilidad de BcePred (véase por ejemplo la Tabla 10), incluyendo K1M, S8I, T9I, K11A en la región de epítipo # 0; D94A en la región de epítipo 4*; y S96I en las regiones de epítipo # 4 y 4*. Además, los resultados para otras sustituciones analizadas utilizando el enfoque computacional BcePred se enumeran en la Tabla 10 que no fueron probados empíricamente.

Tabla 10. Predicciones de epítipos de células B después de la sustitución de aminoácidos

Región de epítipo #	posiciones de aminoácidos posicionadas de forma nativa		
	Región de epítipo de células B	Sustitución	Epítipo de células B por BcePred
0	1-15	K1M	sin cambio
0	1-15	T4I	sin cambio
0	1-15	S8I	sin cambio
0	1-15	T9V	sin cambio
0	1-15	T9I	sin cambio
0	1-15	K11A	sin cambio
0	1-15	K11H	sin cambio
1	27-37	S33I	eliminado
1	27-37	S45V	eliminado
2	39-48	S45I	eliminado
2	39-48 (StxA)	T45I	eliminado
2	39-48	D47G	sin cambio
2	39-48	N48V	sin cambio
2	39-48	N48F	sin cambio

3*	53-66	D53A	sin cambio
3*	53-66	D53G	sin cambio
3*	53-66	D53N	sin cambio
3 y 3*	55-66	R55A	sin cambio
3 y 3*	55-66	R55V	sin cambio
3 y 3*	55-66	R55L	sin cambio
3 y 3*	55-66	D58A	eliminado
3 y 3*	55-66	D58F	eliminado
3 y 3*	55-66	P59A	eliminado
3 y 3*	55-66	P59F	eliminado
3 y 3*	55-66	E60I	eliminado
3 y 3*	55-66	E60T	eliminado
3 y 3*	55-66	E60R	sin cambio
3 y 3*	55-66	E61A	eliminado
3 y 3*	55-66	E61V	eliminado
3 y 3*	55-66	E61L	eliminado
3 y 3*	55-66	G62A	eliminado
4	94-115	D94A	sin cambio
4 y 4*	96-115	S96I	sin cambio
4 y 4*	96-115	S109V	eliminado
4 y 4*	96-115	G110V	eliminado
4 y 4*	96-115	S112V	eliminado
5	141-153	G147A	eliminado
6*	179-190	R179A	sin cambio
6 y 6*	180-190	T180G	sin cambio
6 y 6*	180-190	T181I	sin cambio
6 y 6*	180-190	D183A	sin cambio
6 y 6*	180-190	D183G	sin cambio
6 y 6*	180-190	D184A	eliminado
6 y 6*	180-190	D184F	eliminado
6 y 6*	180-190	L185V	eliminado
6 y 6*	180-190	S186A	eliminado
6 y 6*	180-190	S186F	eliminado
6 y 6*	180-190	G187A	eliminado
6 y 6*	180-190	R188A	eliminado
6 y 6*	180-190	R188L	eliminado
6 y 6*	180-190	S189A	eliminado
7	243-257	S247I	eliminado
7	243-257	R248A	eliminado
7	243-257	R251A	eliminado
8	254-268	D264A	eliminado
8	254-268	G265A	eliminado
8	262-278 (SLT-2A)	G264A	eliminado
9	285-293	T286A	eliminado
9	285-293	T286I	eliminado

El análisis de Western de SLT-1A de tipo salvaje en comparación con D58A SLT-1A (Figura 2) mostró que el enfoque de flexibilidad computacional de BcePred predijo con exactitud la presencia de un epítipo de células B en la posición 55-66 de SLT-1A (Tabla 1), y la alteración de esa región de epítipo por la sustitución D58A también se predijo con precisión (Tabla 10).

Ejemplo 6. Prueba empírica de la inmunogenicidad relativa de un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado en comparación con un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje utilizando un modelo de mamífero

En este ejemplo, se determinó la inmunogenicidad relativa de una proteína citotóxica de-inmunizado de la presente invención en comparación con una proteína citotóxica inmunizado la no-de uso de un modelo de mamífero del sistema inmune humano. Un modelo murino de los sistemas inmunes de mamíferos se utilizó para comparar la inmunogenicidad relativa de una proteína citotóxica de ejemplo que comprende un polipéptido ejemplar de-inmunizado toxina Shiga efectora a la proteína citotóxica parental que comprende una región de la toxina Shiga efector con sólo las secuencias de tipo salvaje. Debido a polipéptidos región efectora de la toxina Shigaas bacteria derivados son extranjera (o no propio) estructuras moleculares a los mamíferos, se esperaba que la toxina Shiga polipéptido efector de tipo salvaje mostraría un cierto nivel de inmunogenicidad. La inmunogenicidad relativa de una proteína de no

mamífero determina usando ratones son generalmente indicativos de inmunogenicidad relativa de esa proteína para todos los mamíferos.

5 Se usó un ensayo ELISA en solución para determinar la cantidad relativa de anticuerpos murinos en suero que eran
 10 específicos para diferentes muestras de proteína citotóxica: proteínas citotóxicas que comprenden o bien un
 polipéptido de tipo salvaje de toxina Shiga efector (aminoácidos 1-251 de SLT- 1A) o un polipéptido de región toxina
 efector ejemplar de-inmunizado Shiga (aminoácidos 1-251 de SLT-1A con ciertas sustituciones de
 15 aminoácidos). Ratones BALB/c hembra fueron asignados aleatoriamente a los grupos para formar grupos con seis
 ratones cada uno. En primer lugar, las muestras de suero se recogieron de cada ratón antes de la exposición a una
 proteína citotóxica. A continuación, cada ratón en un grupo se administró 0,25 mg/kg por dosis de la proteína citotóxica
 que comprende o bien una de tipo salvaje (aminoácidos 1-251 de SLT-1A) o una región toxina efector ejemplar de-
 inmunizado Shiga (aminoácidos 1 -251 de SLT-1A comprende D58A/G110A/G147A/R188A) por inyección intra-
 peritoneal tres veces a la semana durante un periodo de dos semanas para un total de seis inyecciones durante doce
 días. Durante y después del curso de la administración proteína citotóxica, sueros murinos se recogieron a partir de
 ratones de todos los grupos para observar los niveles de anti- "administrados proteínas" usando un ensayo de ELISA
 en solución.

20 El ensayo ELISA anti-"proteína citotóxica" en solución se realizó de la siguiente manera. La misma proteína citotóxicos
 utilizados para inyecciones en un grupo de ratones se incubó durante la noche a 4 ° C en solución con el suero de
 ratones de ese grupo, y luego el complejo inmune (que consiste en la proteína citotóxica vinculado a los anticuerpos
 inducidos en el suero) era capturado usando pocillos de placas de ELISA recubiertas con la proteína diana
 apropiado. Complejos inmunes capturadas que comprenden las IgG murinas se detectaron usando un, anti-IgG de
 25 ratón, anticuerpo secundario con peroxidasa de rábano conjugada. Las placas de ELISA se han desarrollado para
 detectar la actividad de peroxidasa de rábano picante, y se midió la actividad de la peroxidasa de rábano picante o
 "señal de ELISA" a 450 nm usando un lector de placas. Los o "valores ELISA" "ELISA de señal" se calcularon como
 los valores de absorbancia después de restar la señal de fondo medida con un control negativo "sin suero". Para este
 ensayo y la configuración en solución ELISA, mayores valores de ELISA indican las respuestas inmunes más fuertes
 (inducción de anticuerpos).

30 Ninguno de los ratones de cualquier grupo se mide por este ensayo ELISA en solución para tener anticuerpos de suero
 que reconocen ya sea proteína citotóxica antes de la exposición a una proteína citotóxica a través de inyección pre-
 formado. Por lo tanto, cualquier detección post-administración de anticuerpos anti- "proteína citotóxica" en estos
 ratones usando el ensayo ELISA en solución representa indujo la formación de anticuerpos de novo que se produjo
 después de la administración.

35 Para el estudio de inmunogenicidad relativa de este ejemplo, la misma proteína citotóxica se inyecta en un grupo de
 ratones se utilizó en el ensayo ELISA para capturar los anticuerpos en suero de los ratones de ese grupo. En otras
 palabras, los anticuerpos presentes en los sueros de los ratones en el grupo "de tipo salvaje de toxina Shiga efector
 40 región" fueron capturados en el ensayo de ELISA con la proteína citotóxica que comprende una Shiga región toxina
 efector de tipo salvaje, y los anticuerpos presentes en el suero a partir de los ratones en el grupo "de inmunizados con
 la toxina Shiga efector región polipeptídica" fueron capturados en el ensayo de ELISA con la proteína citotóxica de
 ejemplo que comprende el polipéptido ejemplar de-inmunizado toxina Shiga efector región
 (D58A/G110A/G147A/R188A).

45 En el día 15 (3 días después de la administración de la sexta dosis) y el Día 22 (10 días después de la administración
 de la sexta dosis), una respuesta anti- "proteína citotóxica" IgG se midió por el ensayo de ELISA-solución en descrito
 anteriormente (Figura 7). En la figura 7, los símbolos representan los ratones individuales: los símbolos llenos
 representan ratones administrados una proteína citotóxica que comprende de tipo salvaje toxina Shiga región efectora
 50 y los símbolos abiertos representan ratones administrados una proteína citotóxica de ejemplo que comprende una
 toxina Shiga polipéptido de-inmunizado región efectora. En la Figura 7, las líneas verticales indican la señal de
 respuesta IgG media para cada grupo, respectivamente.

Los ratones en el grupo administrado la proteína citotóxica que comprende una Shiga región toxina efector de tipo
 salvaje tuvo una magnitud mayor de la respuesta de anticuerpos como se muestra por la señal de ELISA de los ratones
 55 en el grupo administrado la proteína citotóxica que comprende la toxina de-inmunizado Shiga región efectora
 (D58A/G110A/G147A/R188A) tanto en el día 15 y 22 (Figura 7). El (respuesta de anticuerpos cuantificar) Medio señal
 de ELISA para el grupo "de-inmunizado toxina Shiga efector polipéptido de la región" fue de 25% (Día 15) y 39% (Día
 22) del grupo "de tipo salvaje región efectora de la toxina Shiga". Las diferencias de señal de ELISA entre el
 "polipéptido de la región efectora toxina Shiga de inmunizado-" y el "tipo salvaje región efectora de la toxina Shiga"
 60 grupos fueron estadísticamente significativas sobre la base de pruebas de la t (valor de p era menos de 0,005). El uso
 de un valor de absorbancia de corte nominal de 0,9 unidades de Abs para representar una respuesta de anticuerpos
 "fuerte", 6/6 (100%) ratones en el grupo "de tipo salvaje región efectora de la toxina Shiga" tenía una fuerte respuesta
 de anticuerpos en los días 15 o 22, mientras que los ratones solamente 3/6 (50%) en el grupo "de inmunizados con la
 toxina Shiga región efector polipéptido" tenía una fuerte respuesta de anticuerpos.

65

La proteína citotóxica de ejemplo que comprende el polipéptido de-inmunizado toxina Shiga efector región (D58A/G110A/G147A/R188A) demostraron una reducción de la inmunogenicidad en un modelo de mamífero (Figura 7). La disminución en la magnitud global de la inducción de anticuerpos en ratones en el grupo "de-inmunizado toxina Shiga efector región polipeptídica", así como la reducción en el número de ratones de este grupo que indujo una respuesta de anticuerpos potente, en comparación con el "de tipo salvaje Shiga grupo de la toxina efector región" muestra que el polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de-inmunizado (D58A/G110A/G147A/R188A) fue con éxito de-inmunizado (es decir, ha reducido potencial inmunogénico en mamíferos), y que comprende la proteína citotóxica ejemplar que es una proteína de-inmunizado citotóxica (es decir, ha reducido potencial inmunogénico en los mamíferos).

Este ejemplo de proteína citotóxica desinmunizada comprendía un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga que comprende cuatro alteraciones región del epítipo de células B distintos al tiempo que conserva tres o más Shiga funciones toxina efectoras: inhibición catalítica ribosoma, enrutamiento intracelular, y de citotoxicidad (Tabla 9). Además, se demostró que han alterada epítipos reconocidos por mAb1, pAb2, y PAB1 por Western blot (Figura 5) y mAb1 mediante un ensayo ELISA (Figura 6) la toxina Shiga efector polipéptido de la región de-inmunizados de esta proteína citotóxica. Por lo tanto, esta proteína citotóxica de ejemplo es una proteína citotóxica de-inmunizado que comprende un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de-inmunizado que tiene tanto antigenicidad reducida y la inmunogenicidad a los sistemas inmunes de mamíferos. La antigenicidad y/o inmunogenicidad de esta proteína citotóxica modo de ejemplo puede reducirse aún más mediante la introducción de mutaciones adicionales en las mismas o adicionales regiones de epítipo de células B predichos. Además, las sustituciones alternativas en las mismas o diferentes posiciones en las regiones de epítipo de células B ya perturbado resultará inmunogenicidad reducida relativa.

Las inmunogenicidades relativas de diversos polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados o proteína citotóxica de ejemplo que comprende varias regiones de polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados se ensayan de una manera similar. Ciertos polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados de ejemplo, incluyendo

1. (1-251: K1M/K11A/S33I/S45I/D58A/G110A/G147A/R188A),
2. (1-251: K1M/K11A/S33I/S45I/D58A/G110A/G147A/D183A/D184A/R188A),
3. (1-251: K1M/K11A/S33I/S45I/D58A/E60I/G110A/G147A/D183A/D184A/R188A),
4. (1-251: K1M/K11A/S33I/S45I/R55A/D58A/P59A/E60I/E61A/G62A/G110A/G147A/D183A/D184A/R188A),
5. (1-251: K1M/K11A/S33I/S45I/D58A/G110A/G147A/D183A/D184A/S189A) y
6. (1-251: K1M/K11A/S33I/S45I/R55A/D58A/P59A/E60I/E61A/G62A/G110A/G147A/D183A/D184A/R188A/R205A), y

SEQ ID NOs: 4-52 se comparan con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga que comprenden solo secuencias de aminoácidos de tipo salvaje y/o proteínas citotóxicas parentales que comprenden regiones polipeptídicas efectoras de toxina Shiga de tipo salvaje usando modelos animales y ensayos descritos en el presente documento o conocidos por el experto.

En este ejemplo, los ratones son administrados por vía intravenosa las formas desinmunizadas o de tipo salvaje 4 veces a intervalos de 7 días. Se toman muestras de sangre de los ratones inyectados y se ensayan mediante ensayos ELISA para la reactividad a las proteínas citotóxicas y/o al polipéptido efector de la toxina Shiga. Se medirán las respuestas inmunogénicas relativamente reducidas en ratones inyectados con ciertos polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados o proteína citotóxica que comprende los mismos, en comparación con moléculas que comprenden polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga que comprenden solamente secuencias de aminoácidos de tipo salvaje.

Ciertas proteínas citotóxicas desinmunizadas de ejemplo que comprenden polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados de ejemplo que comprenden múltiples alteraciones en la región del epítipo de células B retendrán un nivel significativo de uno o más funciones efectoras de la toxina Shiga: inhibición catalítica de ribosomas, enrutamiento intracelular y citotoxicidad y tienen un reconocimiento reducido por anticuerpos preformados que reconocen anticuerpos anti-subunidad A de toxina similar a Shiga en transferencia Western y/o un ensayo ELISA. Estas proteínas citotóxicas de ejemplo que comprenden polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados con alteraciones en múltiples regiones de epítipo de células B son polipéptidos de la región efectora de toxina Shiga desinmunizados con antigenicidad y/o inmunogenicidad reducidas.

Resumen

Los ejemplos anteriores demostraron que las regiones de epítipo de células B dentro de los polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga se pueden alterar mediante sustituciones de aminoácidos y dan como resultado reducciones tanto en la antigenicidad como en la inmunogenicidad. Las sustituciones de residuos de aminoácidos dentro de las regiones de epítipos predichas de polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga en el contexto de una proteína citotóxica que retiene al menos una función de la toxina Shiga se resumen en la Tabla 11. Todas las sustituciones de ejemplo dieron lugar a regiones efectoras de la toxina Shiga que funcionalmente retienen una alta citotoxicidad con alteración concomitante de uno o más epítipos de células B, excepto la sustitución R179A que interfirió con dos o más funciones efectoras de la toxina Shiga.

Tabla 11. Resumen de sustituciones en regiones de epítomos de células B que retienen funciones efectoras de la toxina Shiga

posiciones de aminoácidos posicionados de forma nativa				
Región de epítomo de células B	sustitución(es)	Predicción de epítomo	Inhibición de ribosomas	Citotoxicidad
0: 1-15	K1M/K11A	sin cambio	SÍ	SÍ
0: 1-15	S8I	sin cambio	SÍ	SÍ
0: 1-15	T9I	sin cambio	SÍ	SÍ
1: 27-37	S33I	eliminado	SÍ	SÍ
2: 39-48	S45I	eliminado	SÍ	SÍ
3*: 53-66	D53A	sin cambio	SÍ	SÍ
3/3*: 55-66	R55A	sin cambio	SÍ	SÍ
3/3*: 55-66	D58A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*: 55-66	D58F	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*: 55-66	P59A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*: 55-66	E60I	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*: 55-66	E60R	sin cambio	SÍ	SÍ
3/3*: 55-66	E61A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*: 55-66	G62A	eliminado	SÍ	SÍ
4*: 94-115	D94A/S96I	sin cambio	SÍ	SÍ
6: 180-190	D183A	sin cambio	SÍ	SÍ
6: 180-190	D184A	eliminado	SÍ	SÍ
6: 180-190	D184F	eliminado	SÍ	SÍ
6: 180-190	R188A	eliminado	SÍ	SÍ
6: 180-190	D183A/D184A/R188A	eliminado	SÍ	SÍ
residuo inmunogénico	R205A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*	E60I/G110A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 5	E60I/G147A	eliminado	SÍ	SÍ
2, 6/6*	S45I/R188A	eliminado	SÍ	SÍ
1, 4/4*, 5	S33I/G110A/G147A	eliminado	SÍ	SÍ
2, 4/4*, 5	S45I/G110A/G147A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*, 5	D58A/G110A/G147A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*, 5	E60I/G110A/G147A	eliminado	SÍ	SÍ
2, 3/3*, 4/4*, 5	S45I/D58A/E60I/G110A/G147A	eliminado	SÍ	SÍ
2, 3/3*, 4/4*, 5	S45I/D58A/E60I/G62A/G110A/G147A	eliminado	SÍ	SÍ
2, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/G110A/G147A/D183A/D184A/R188A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*, 5, 6	D58A/G110A/G147A/S186A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/G110A/G147A/G187A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/G110A/G147A/R188A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/G110A/G147A/S189A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/G110A/G147A/S186A/R188A	eliminado	SÍ	SÍ
3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	D58A/G110A/G147A/G187A/R188A	eliminado	SÍ	SÍ
1, 2, 3/3*, 4/4*, 5	S33I/S45I/D58A/G110A/G147A	eliminado	SÍ	SÍ
2, 3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/D58A/E60I/G110A/G147A/D183A/D184A/R188A	eliminado	SÍ	SÍ
2, 3/3*, 4/4*, 5, 6/6*	S45I/D58A/E60I/G62A/G110A/G147A/D183A/D184A/R188A	eliminado	SÍ	SÍ

5 A pesar de los desafíos que predicen sustituciones exitosas a priori, los datos proporcionados en los Ejemplos en el presente documento dan razones para creer que ciertas sustituciones de aminoácidos es probable que reduzcan con

éxito la antigenicidad y/o inmunogenicidad mientras se mantiene una función o funciones efectoras significativas de la toxina Shiga. Por ejemplo, las sustituciones en las posiciones de aminoácidos específicas mostradas en este documento como sustituciones tolerantes con éxito (Tabla 11) probablemente tienen éxito para retener al menos una función efectora de la toxina Shiga cuando se sustituyen por ciertos otros aminoácidos. La demostración de que proteínas citotóxicas que comprenden regiones efectoras de toxina Shiga retenían citotoxicidad cuando se combinaban múltiples sustituciones de un solo aminoácido (predichas para alterar una región de epítipo y que retienen la citotoxicidad) (Tabla 9; Tabla 11) sugiere que la sustitución de un solo aminoácido con éxito generalmente se puede combinar con otras sustituciones de aminoácidos con éxito en una región de epítipo diferente para generar polipéptidos efectoras de la toxina Shiga desinmunizados que retienen la función o funciones efectoras significativas de la toxina Shiga. Del mismo modo, la demostración de que proteínas citotóxicas que comprenden regiones efectoras de toxina Shiga con múltiples sustituciones de un solo aminoácido dentro de la misma región del epítipo retienen la actividad enzimática (Tabla 9; Tabla 11) sugiere que el éxito de la sustitución de un solo aminoácido en la misma región de epítipo generalmente se puede combinar con otras sustituciones de un solo aminoácido en la misma región de epítipo para generar polipéptidos efectoras de toxina Shiga desinmunizados que retienen la función o funciones efectoras significativas de la toxina Shiga. El hecho de que las proteínas citotóxicas que comprenden polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga con múltiples sustituciones de un solo aminoácido dentro de la misma región del epítipo retenían la citotoxicidad (Tabla 9; Tabla 11) sugiere que el éxito de la sustitución de un solo aminoácido en una región de epítipo se puede combinar con otras sustituciones de un solo aminoácido en la misma región de epítipo para generar polipéptidos efectoras de la toxina Shiga desinmunizados que retienen la función o funciones efectoras significativas de la toxina Shiga.

Los datos empíricos demuestran que ciertas sustituciones (K1M, S8I, T9I, K11A, S33I, S45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, D183A, D184A, D184F, R188A, R205A, y/o combinaciones de los mismos) y ciertas posiciones toleraron sustituciones (1, 4, 8, 9, 11, 33, 45, 48, 53, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 94, 96, 109, 110, 147, 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 205, 248, y 251) al tiempo que conservaban un nivel significativo de la actividad para al menos una función efectora de la toxina Shiga. Estos datos empíricos sugieren ciertas otras sustituciones de alteración de epítipo y combinaciones de sustituciones de alteración de epítipo que pueden usarse para generar polipéptidos efectoras de la toxina Shiga desinmunizados que retienen la función o funciones efectoras significativas de la toxina Shiga. Es previsible que también se tolerarán otras sustituciones de aminoácidos a residuos de aminoácidos de un grupo funcional conservativo. Por ejemplo, otras sustituciones conocidas para el experto que son similares a cualquiera de K1M, T4I, S8I, T9V, T9I, K11A, S33I, S45V, S45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55L, I57F, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, G110A, S112V, G147A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R205A, R248A o R251A también serán capaces de alterar un epítipo mientras se mantiene al menos una función efectora de la toxina Shiga. En particular, las sustituciones de aminoácidos a los residuos de aminoácidos conservativos similares a K1M, T4I, S8I, T9V, T9I, K11A, S33I, S45V, S45I, D47G, N48V, N48F, L49A, D53A, D53G, D53N, R55A, R55L, I57F, D58A, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, S109V, G110A, S112V, G147A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, R205A, R248A o R251A tendrán el mismo efecto. Los ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos similares incluyen K1 a A, G, V, L, I, F, y H; T4I a A, G, V, L, F, M y S; S8 a A, G, V, L, F, y M; T9 a A, G, L, F, M y S; K11 a G, V, L, I, F, y M; S33 a A, G, V, L, F, y M; S45 a A, G, L, F, y M; T45 a A, G, V, L, I, F, y M; D47 a A, V, L, I, F, S, y Q; N48 a A, G, L, I, y M; L49 a G; D53 a V, L, I, F, S, y Q; R55 a G, I, F, M, Q, S, K, y H; D58 a G, V, L, I, S, y Q; P59 a G; E60 a A, G, V, F, S, Q, N, D, y M; E61 a G, I, F, S, Q, N, D, M y R; D94 a G, V, L, I, F, S, y Q; S96 a A, G, V, L, F, y M; S109 a A, G, I, L, F, y M; T109 a A, G, V, I, L, F, y M; S112 a A, G, L, I, F, y M; T180 a A, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, F, M y S; D183 a V, L, I, F, S, y Q; D184 a G, V, L, I, S, y Q; L185 a A y G; S186 a G, V, I, L, F, y M; R188 a G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; S189 a G, V, I, L, F, y M; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K, y H; S247 a A, G, V, I, L, F, y M; Y247 a A, G, V, L, I y F, R248 a G, V, L, y I; R250 a A, G, V, L, I, y F; y R251 a G, V, L y I.

Las sustituciones de aminoácidos que eliminan carga, polaridad, y/o reducen la longitud de la cadena lateral también serán capaces de alterar un epítipo mientras se mantiene al menos una función efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, la sustitución de A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H, y K al residuo de aminoácido K1, T4, S8, T9, K11, S33, S45, D47, N48, L49, D53, R55, 157, D58, P59, E60, E61, G62, D94, S96, S109, T109, G110, S112, G147, T180, T181, D183, D184, L185, S186, G187, R188, S189, R205, R248 o R251 de manera que la carga de la cadena lateral se elimina, se elimina la polaridad y/o se reduce la longitud de la cadena lateral. En particular, las siguientes sustituciones de aminoácidos serán capaces de alterar un epítipo mientras se mantiene al menos una función efectora de la toxina Shiga: D47, D53, D58, D94, D183, D184, D264 a A, G, V, L, I, S, y N; E60 o E61 a A, G, L, V, I, S, N, Q, D, y M; G62, G110, G147, G187 o G265 a A; K1 o K11 a A, G, L, V, I, F, C, M, P, S, T, N, H y Q; L49 o L185 a A y G; N48 a A, G, V, L, y I; R55, R188, R205, R247, R248, R250 o R251 a A, G, L, V, I, S, Q, K, M, F, y H; S33, S45, S96, S109, S112, S186, o S189 a A, G, V, y L, y T4, T9, T45, T109, T180, T181, T286 a A, G, V, L, I, M y F.

Además, la sustitución de aminoácido en una región de epítipo de un polipéptido efectora de la toxina Shiga que altera un epítipo al tiempo que conserva la función efectora significativa de la toxina Shiga generalmente se prevé que sea combinable con otras sustituciones de aminoácidos en la misma o una región de epítipo diferente que altere un epítipo al tiempo que conserva la función efectora significativa de la toxina Shiga para formar un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado con múltiples regiones de epítipo alteradas al tiempo que conserva un nivel

significativo de una función efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, K1M, S8I, T9I, S9I, K11A, S33I, S45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, y/o R205A puede combinarse cuando sea posible con K1M, S8I, T9I, S9I, K11A, S33I, S45I, D53A, R55A, D58A, D58F, P59A, E60I, E60R, E61A, G62A, D94A, S96I, G110A, G147A, D183A, D184A, D184F, S186A, G187A, R188A, S189A, y/o R205A para crear polipéptidos de la región efectora de la toxina Shiga desinmunizados de la presente invención.

Ejemplo 7. Proteína citotóxica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado y una región de unión específica para CD20 (α CD20 fusionado con SLT-1A)

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado derivado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desinmunizantes descritas en los ejemplos anteriores. Una región de unión de tipo inmunoglobulina antigénico de α CD20 deriva de un dominio de tipo inmunoglobulina que reconoce CD20 humano (véase, por ejemplo Haisma et al, Blood 92: 184-90 (1999); Geng S et al, Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006); Olafesn T et al, Protein Eng Des Sel. 23: 243-9 (2010)), que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a una parte extracelular de CD20. CD20 se expresa en varios tipos de células cancerosas, tales como, por ejemplo, células de linfoma de células B, células de leucemia de células pilosas, células de leucemia linfocítica crónica de células B, y células de melanoma. Además, CD20 es una diana atractiva para agentes terapéuticos para el tratamiento de ciertas enfermedades autoinmunes, trastornos y afecciones que implican células B hiperactivas.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD20

La región de unión de tipo inmunoglobulina α CD20 y la región efectora de la toxina Shiga (tal como, por ejemplo, las SEQ Id NO: 4-52) se unen entre sí. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno de α CD20 SLT-1A:: α CD20 (véase, por ejemplo, las SEQ ID NOs: 53, 54, 55 y 56). La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD20 se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores o es conocido por un experto.

Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD20

Las características de unión, la unión específica máxima (B_{max}) y las constantes de unión en equilibrio (K_D) de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células CD20+ y células CD20- se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para SLT-1A:: α CD20 a las células CD20+ se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células CD20- en este ensayo.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD20 se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α CD20 en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD20 utilizando un ensayo de eliminación celular CD20+

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α CD20 se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células CD20+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A:: α CD20 se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células CD20- como una comparación con las células CD20+. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células CD20+, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan CD20 en una superficie celular, en comparación con células que expresan CD20 en una superficie celular.

Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

La desinmunización relativa de SLT-1A:: α CD20 se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

Determinación de los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD20 utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD20 sobre las células neoplásicas. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la

administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan CD20 en sus superficies celulares.

5 **Ejemplo 8. Proteína citotóxica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desimmunizado y una región de unión específica a HER2 ("αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A")**

10 En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se deriva de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desimmunizantes descritas en los ejemplos anteriores. La región de unión de tipo inmunoglobulina es V_HH de αHER2 derivado de una región variable de un solo dominio de la proteína 5F7 del anticuerpo camélido (V_HH), tal como se describe en la Solicitud de patente de EE.UU. 2011/0059090.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A"

15 La región de unión de tipo inmunoglobulina y la región efectora de toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína fusionada (véase, por ejemplo, SEQ ID NOs: 57, 58, y 59). En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región variable V_HH de αHER2 derivada de la proteína 5F7 puede clonarse en el marco con un polinucleótido que codifica un enlazador conocido en la técnica y en marco con un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga que comprende los aminoácidos de SEQ ID NOs: 4-52. Las variantes de proteínas citotóxicas "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A" se crean de tal manera que la región de unión está opcionalmente situada adyacente al extremo amino-terminal de la región efectora de la toxina Shiga y opcionalmente comprende un motivo de señal de retículo endoplásmico carboxi-terminal de la familia KDEL. La expresión de las variantes de proteínas citotóxicas "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A" se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianas y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

25 Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A"

30 Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células HER2+ y células HER2- se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para variantes de "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A" a las células HER2+ se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células HER2- en este ensayo.

35 Las capacidades de inactivación de ribosomas de las proteínas citotóxicas "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A" se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC₅₀ de variantes de "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

40 Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A" utilizando un ensayo de eliminación celular de HER2+

45 Las características de citotoxicidad de las variantes de "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A" se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células HER2+. Además, las características de citotoxicidad selectivas de "αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A" se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células HER2- como una comparación con las células HER2+. La CD₅₀ de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células HER2+, dependiendo de la línea celular. La CD₅₀ de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan HER2 en una superficie celular, en comparación con células que expresan HER2 en una superficie celular.

50 Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

55 La desimmunización relativa de αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

Determinación de efectos in vivo de la proteína citotóxica αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A utilizando modelos animales

60 Se utilizan modelos animales para determinar los efectos in vivo de la proteína citotóxica αHER2-V_HH fusionado con SLT-1A en células neoplásicas. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan HER2 en sus superficies celulares.

Ejemplo 9. Proteína citotóxica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado y una región de unión derivada del antígeno de α Epstein-Barr de anticuerpo

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado derivado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desinmunizantes descritas en los ejemplos anteriores. Una región de unión de tipo inmunoglobulina antígeno de α Epstein-Barr deriva de un anticuerpo monoclonal contra un antígeno de Epstein Barr (Fang C et al, Immunol Methods J 287: 21-30 (2004)), que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a una célula humana infectada por el virus de Epstein-Barr o una célula transformada que expresa un antígeno de Epstein-Barr. El antígeno de Epstein-Barr se expresa en varios tipos de células, tales como células infectadas por un virus de Epstein-Barr y células de cáncer (por ejemplo, células de cáncer de linfoma y nasofaríngeo). Además, la infección de Epstein-Barr se asocia con otras enfermedades, por ejemplo, esclerosis múltiple.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EpsteinBarr::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina antígeno de α Epstein-Barr y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y un KDEL carboxi-terminal (SEQ ID NO: 60) se añade para formar una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno de α Epstein-Barr SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células positivas del antígeno de Epstein-Barr y células negativas de antígeno de Epstein-Barr se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL a las células positivas de antígeno de Epstein-Barr se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de antígeno de Epstein-Barr en este ensayo.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de antígeno de Epstein-Barr. Además, las características de citotoxicidad selectivas de SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de antígeno de Epstein-Barr como una comparación con las células positivas de antígeno de Epstein-Barr. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células positivas de antígeno de Epstein-Barr, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan el antígeno de Epstein-Barr en una superficie celular, en comparación con células que expresan el antígeno de Epstein-Barr en una superficie celular.

Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

La desinmunización relativa de SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

Determinación de los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL utilizando modelos de animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Epstein-Barr::KDEL en células neoplásicas. Varias cepas de ratones se utilizan para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan antígenos de Epstein-Barr en sus superficies celulares.

Ejemplo 10. Proteína citotóxica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado y una región de unión derivada del antígeno de α Leishmania-Barr de anticuerpo

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado derivado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desinmunizantes descritas en los ejemplos previos. Una región de tipo inmunoglobulina antígeno de α Leishmania deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, a un antígeno de Leishmania de la superficie celular presente en las células humanas que albergan protozoos tripanosomátidos intracelulares (ver Silveira T et al., Int J Parasitol 31: 1451-8 (2001); Kenner J et al, J Cutan Pathol 26: 130-6 (1999); Berman J y Dwyer, Clin Exp Immunol 44: 342-348 (1981)).

10 Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina antígeno de α Leishmania y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y un KDEL carboxi-terminal (SEQ ID NO: 60) se añade para formar una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno de α Leishmania SLT-1A:: α Leishmania::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

20 Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células positivas del antígeno de Leishmania y células negativas de antígeno de Leishmania se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para SLT-1A:: α Leishmania::KDEL a las células positivas de antígeno de Leishmania se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de antígeno de Leishmania en este ensayo.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α Leishmania::KDEL en la síntesis de proteínas libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

35 Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de antígeno de Leishmania. Además, las características de citotoxicidad selectivas de SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de antígeno de Leishmania como una comparación con las células positivas de antígeno de Leishmania. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células positivas de antígeno de Leishmania, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan el antígeno de Leishmania en una superficie celular, en comparación con células que expresan el antígeno de Leishmania en una superficie celular.

45 Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

La desinmunización relativa de SLT-1A:: α Leishmania::KDEL se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

Ejemplo 11. Proteína citotóxica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado y una región de unión derivada de una región de unión de tipo inmunoglobulina receptor de α neurotensina

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado derivado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desinmunizantes descritas en los ejemplos previos. Una región de tipo inmunoglobulina receptor de alfa-neurotensina deriva del DARPin™ (GenBank Acceso: 2P2C_R) o un anticuerpo monoclonal (Ovigne J et al, Neuroptides. 32: 247-56 (1998)) que se une el receptor de neurotensina humana. El receptor de neurotensina es expresado por varias células cancerosas, tales como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, melanoma, y células de cáncer pancreático.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina α NeurotensinaR y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y un KDEL carboxi-terminal (SEQ ID NO: 60) se añade para formar una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno de α NeurotensinaR SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células positivas del receptor de Neurotensina y células negativas del receptor de Neurotensina se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL a las células positivas de receptor de Neurotensina se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de receptor de Neurotensina en este ensayo.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de receptor de Neurotensina. Además, las características de citotoxicidad selectivas de SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de receptor de Neurotensina como una comparación con las células positivas de receptor de neurotensina. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células positivas de receptor de NeurotensinaR, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan el receptor de Neurotensina en una superficie celular, en comparación con células que expresan el receptor de Neurotensina en una superficie celular.

Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

La desinmunización relativa de SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

Determinación de los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL utilizando modelos de animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinaR::KDEL en células neoplásicas. Varias cepas de ratones se utilizan para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan receptores de neurotensina en sus superficies celulares.

Ejemplo 12. Proteína citotóxica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado y una región de unión derivada de una región de unión de tipo inmunoglobulina α EGFR

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado derivado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desinmunizantes descritas en los ejemplos previos. Una región de unión α EGFR se deriva de AdNectin™ (GenBank Acceso: 3QWQ_B), el Affibody™ (GenBank adhesión: 2KZI_A; patente de EE.UU. 8.598.113), o un anticuerpo, todos los cuales se unen a uno o más receptores del factor de crecimiento epidérmico humano. La expresión de los receptores del factor de crecimiento epidérmico se asocia con las células humanas de cáncer, tales como, por ejemplo, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de mama y células de cáncer de colon.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina α EGFR y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y un KDEL carboxi-terminal (SEQ ID NO: 60) se añade para formar una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a EGFR SLT-1A:: α EGFR::KDEL. La

expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células EGFR+ y células EGFR- se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para SLT-1A:: α EGFR::KDEL a las células EGFR+ se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células EGFR- en este ensayo.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α EGFR::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α EGFR::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células EGFR+. Además, las características de citotoxicidad selectivas de SLT-1A:: α EGFR::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células EGFR- como una comparación con las células positivas de antígeno de Leishmania. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células EGFR+, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan EGFR en una superficie celular, en comparación con células que expresan EGFR en una superficie celular.

Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

La desinmunización relativa de SLT-1A:: α EGFR::KDEL se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

Determinación de los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL utilizando modelos de animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR::KDEL en células neoplásicas. Varias cepas de ratones se utilizan para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan EGFR(s) en sus superficies celulares.

Ejemplo 13. Proteína citotóxica que comprende polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado y una región de unión derivada del anticuerpo α CCR5

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desinmunizantes descritas en los ejemplos anteriores. Una región de unión de tipo inmunoglobulina α CCR5 deriva de un anticuerpo monoclonal contra CCR5 humano (CD195) (Bernstone L et al, Hybridoma 31.: 7-19 (2012)). CCR5 se expresa predominantemente en las células T, macrófagos, células dendríticas, y microglia. Además, CCR5 juega un papel en la patogénesis y la propagación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CCR5::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina α CCR5 y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y un KDEL carboxi-terminal (SEQ ID NO: 60) se añade para formar una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a α CCR5 SLT-1A:: α CCR5::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CCR5::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CCR5

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células CCR5+ y células CCR5- se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para SLT-1A:: α CCR5::KDEL a las células CCR5+ se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células CCR5- en este ensayo.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC₅₀ de SLT-1A::αCCR5::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αCCR5::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células CCR5+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A::αCCR5::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células CCR5- como una comparación con las células CCR5+. La CD₅₀ de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células CCR5+, dependiendo de la línea celular. La CD₅₀ de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan CCR5 en una superficie celular, en comparación con células que expresan CCR5 en una superficie celular.

Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

La desinmunización relativa de SLT-1A::αCCR5::KDEL se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

Determinación de los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL utilizando modelos animales

Los modelos animales se utilizan para determinar los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5::KDEL en el agotamiento de células T de materiales donantes (ver Tsirigotis P et al, Immunotherapy 4: 407-24 (2012)). Los primates no humanos se utilizan para determinar los efectos in vivo de SLT-1A::αCCR5. La enfermedad de injerto contra huésped se analiza en macacos rhesus después del trasplante renal cuando los órganos donados se tratan previamente con SLT-1A::αCCR5::KDEL (véase Weaver T et al, Nat Med. 15: 746-9 (2009)). Se observa el agotamiento in vivo de linfocitos T de sangre periférica en primates cynomolgus después de la administración parenteral de diferentes dosis de SLT-1A::αCCR5::KDEL. El uso de SLT-1A::αCCR5::KDEL para bloquear la infección por VIH se analiza administrando una dosis aguda de SLT-1A::αCCR5::KDEL a primates no humanos con el fin de agotar severamente las células T circulantes tras la exposición a un virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) (ver Sellier P et al, PLoS One 5: e10570 (2010)).

Ejemplo 14. Proteína citotóxica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado y una región de unión derivada de un dominio de inmunoglobulina anti-Env

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado derivado de la subunidad A de la toxina Shiga (stxA) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desinmunizantes descritas en los ejemplos anteriores. Una región de unión de tipo inmunoglobulina αEnv deriva de anticuerpos existentes que se unen a la glicoproteína de cubierta del VIH (Env), tales como GP41, GP120, GP140 o GP160 (véase, por ejemplo Chen W et al, J Mol Bio 382: 779-89 (2008); Chen W et al, Expert Opin Biol Ther 13: 657-71 (2013); van den Kerkhof T et al, Retrovirology 10: 102 (2013)) o de anticuerpos generados usando técnicas estándar (ver Prabakaran et al., Front Microbiol 3: 277 (2012)). Env son proteínas de superficie del VIH que también se muestran en las superficies celulares de las células infectadas por el VIH durante la replicación del VIH. Aunque Env se expresan en las células infectadas predominantemente en compartimientos endosomal, cantidades suficientes de Env podrían estar presentes en una superficie celular a reconocer por una proteína citotóxica muy potente de la presente invención. Además, las proteínas citotóxicas que reconocen Env podrían unirse a viriones de VIH y entrar en células recién infectadas durante la fusión de viriones con una célula huésped.

Dado que el VIH muestra una alta tasa de mutación, es preferible utilizar un dominio de inmunoglobulina que se una a una parte limitada funcional de un Env, tal como se muestra mediante anticuerpos ampliamente neutralizantes que se unen a Env de múltiples cepas del VIH (van den Kerkhof T et al., Retrovirology 10: 102 (2013)). Debido a que se cree que las Env presentes en la superficie de una célula infectada presentan epítomos estéricamente restringidos (Chen W et al, J Virol. 88: 1125-1139 (2014)), es preferible usar más pequeño que 100 kD e idealmente menor que 25 kD, como sdAbs o dominio V_HH.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A::αEnv::KDEL

La región de unión de tipo inmunoglobulina αEnv y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y un KDEL carboxi-terminal (SEQ ID NO: 60) se añade para formar una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce

mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a α Env SLT-1A:: α Env::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

5 Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL

10 Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células Env+ y células Env- se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para SLT-1A:: α Env::KDEL a las células Env+ se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células Env- en este ensayo.

15 Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibidor de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A:: α Env::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

20 Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α Env::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células Env+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A:: α Env::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células Env- como una comparación con las células Env+. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células Env+, dependiendo de la línea celular. La CD_{50} de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan Env en una superficie celular, en comparación con células que expresan Env en una superficie celular.

Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

30 La desinmunización relativa de SLT-1A:: α Env::KDEL se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

35 Determinación de los efectos in vivo de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Env::KDEL utilizando modelos animales

40 El uso de SLT-1A:: α Env::KDEL para inhibir la infección por VIH se prueba mediante la administración de SLT-1A:: α Env::KDEL a primates no humanos infectados por el virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV) (ver Sellier P et al., PLoS One 5: e10570 (2010)).

Ejemplo 15. Proteína citotóxica que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado y una región de unión derivada del anticuerpo α UL18

45 En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido toxina efector de la toxina Shiga desinmunizado derivado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) y que comprende una o más sustituciones de aminoácidos desinmunizantes descritos en los ejemplos anteriores. Una región de unión de tipo inmunoglobulina α UL18 deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, a la proteína de citomegalovirus de la superficie celular UL18, que está presente en las células humanas infectadas con el citomegalovirus (Yang Z, Bjorkman P, Proc Natl Acad Sci USA. 105: 10095-100 (2008)). La infección por citomegalovirus humano se asocia con varios tipos de cáncer y trastornos inflamatorios.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α UL18::KDEL

55 La región de unión de tipo inmunoglobulina α UL18 y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí, y un KDEL carboxi-terminal (SEQ ID NO: 60) se añade para formar una proteína. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a α UL18 SLT-1A:: α UL18::KDEL. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α UL18::KDEL se logra usando sistemas de traducción de proteína, ya sea bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

60 Determinación de las características in vitro de la proteína citotóxica SLT-1A:: α UL18::KDEL

65 Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para las células positivas de proteína de citomegalovirus UL18 y células negativas de proteína de citomegalovirus UL18 se determina mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B_{max} para SLT-1A:: α UL18::KDEL a las células positivas de proteína de citomegalovirus UL18 se mide que es aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del intervalo de 0,01-

100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de proteína de citomegalovirus UL18 en este ensayo.

5 Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::αUL18::KDEL se determina en una traducción de proteínas libre de células in vitro como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC₅₀ de SLT-1A::αUL18::KDEL en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

10 Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A::αUL18::KDEL utilizando un ensayo de eliminación celular

15 Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αUL18::KDEL se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de proteína de citomegalovirus UL18. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A::αUL18::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de proteína de citomegalovirus UL18 como una comparación con las células positivas de proteína de citomegalovirus UL18. La CD₅₀ de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para las células positivas de proteína de citomegalovirus UL18, dependiendo de la línea celular. La CD₅₀ de la proteína citotóxica es de aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan la proteína de citomegalovirus UL18 en una superficie celular, en comparación con células que expresan la proteína de citomegalovirus UL18 en una superficie celular.

25 Determinación de reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad

La desinmunización relativa de SLT-1A::αUL18::KDEL se determina en relación con un polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje mediante análisis Western, análisis ELISA y modelos murinos tal como se describe en los Ejemplos 4 y 6.

30 Ejemplo 16: Proteínas citotóxicas desinmunizadas que reconocen varios tipos de células

35 En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga es un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado derivado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A), toxina Shiga (stxA) y/o toxina similar a Shiga 2 (SLT-2A) con cualquier combinación de regiones de epítipo de células B alteradas. Una región de unión deriva del dominio de inmunoglobulina de la molécula elegida de la columna 1 de la Tabla 12 y que se une a la biomolécula diana extracelular indicada en la columna 2 de la Tabla 12. Las proteínas citotóxicas ejemplares de este ejemplo están opcionalmente creadas con un motivo señal de tipo KDEL carboxi-terminal y/o un agente o agentes promotores de la detección usando reactivos y técnicas conocidas en la técnica. Las proteínas citotóxicas de ejemplo de este ejemplo se ensayan como se describe en los ejemplos anteriores utilizando células que expresan las biomoléculas diana extracelulares apropiadas. Las proteínas de ejemplo de este ejemplo se pueden usar, por ejemplo, para diagnosticar y tratar enfermedades, afecciones y/o trastornos indicados en la columna 3 de la Tabla 12.

Tabla 11. Varias regiones de unión para el reconocimiento celular de proteína citotóxicas

Fuente de la región de unión	Diana extracelular	Aplicación o aplicaciones
alemtuzumab	CD52	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
basiliximab	CD25	trastornos de células T, tales como la prevención de rechazos de trasplante de órganos y algunos cánceres del linaje de células B
brentuximab	CD30	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
catumaxomab	EpCAM	varios cánceres, tales como cáncer de ovario, ascitis maligna, cáncer gástrico
cetuximab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorrectal y de cabeza y cuello
daclizumab	CD25	cánceres de linaje de células B y trastornos de células T, tales como el rechazo de trasplante de órganos
daratumumab	CD38	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T

dinutuximab	gangliósido GD2	Varios cánceres, tales como cáncer de mama, cánceres mieloides y neuroblastoma
efalizumab	LFA-1 (CD11a)	trastornos autoinmunes, tales como psoriasis
ertumaxomab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
gemtuzumab	CD33	cáncer mieloides o trastorno inmunitario
ibritumomab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ipilimumab	CD152	trastornos relacionados con células T y varios cánceres, tales como leucemia, melanoma
muromonab	CD3	prevención de los rechazos de trasplante de órganos
natalizumab	integrina $\alpha 4$	trastornos autoinmunes, tales como esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn
obinutuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ocaratuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ocrelizumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ofatumumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
palivizumab	Proteína F del virus sincitial respiratorio	tratar el virus sincitial respiratorio
panitumumab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y cáncer de cabeza y cuello
pertuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
pro 140	CCR5	infección por VIH y trastornos de células T
ramucirumab	VEGFR2	varios cánceres y trastornos relacionados con cáncer, tales como tumores sólidos
rituximab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
tocilizumab o atlizumab	receptor de IL-6	trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide
tositumomab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
trastuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
ublituximab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
vedolizumab	integrina $\alpha 4\beta 7$	trastornos autoinmunes, tales como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa
scFv de unión a CD20. Geng S et al. Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006); Olafesn T et al. Protein Eng Des Sel 23: 243-9 (2010)	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
scFv de unión a CD22. Kawas S et al. MAbs s: 479-86 (2011)	CD22	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B
scFv de unión a CD25. Muramatsu H et al., Cancer Lett 225: 225-36 (2005)	CD25	varios cánceres de linaje de células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD30. Klimka A et al., Br J Cancer 83: 252-60 (2000)	CD30	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B/células T

anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD33. Benedict C et al., J Immunol Methods 201: 223-31 (1997)	CD33	cáncer mielóide o trastorno inmunitario
dominios de inmunoglobulina de unión a CD38. Patente de Estados Unidos 8,153,765	CD38	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
scFv de unión a CD40. Ellmark P et al., Immunology 106: 456-63 (2002)	CD40	varios cánceres y trastornos inmunitarios
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD52. Patente de Estados Unidos 7,910,104 B2)	CD52	Cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD56. Shin J et al., Hybridoma 18: 521-7 (1999)	CD56	trastornos inmunitarios y varios cánceres, tales como cáncer de pulmón, Merkel cell carcinoma, mieloma
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD79. Zhang L et al. Ther. Immunol. 2: 191-202 (1995)	CD79	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B
scFv de unión a CD248. Zhao A et al., J Immunol Methods 363: 221-32 (2011)	CD248	varios cánceres, tales como angiogénesis inhibidora
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a EpCAM. Schanzer J et al., J Immunother 29: 477-88 (2006))	EpCAM	varios cánceres, tales como cáncer de ovario, ascitos malignos, cáncer gástrico
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a PSMA. Frigerio B et al., Eur J Cancer 49: 2223-32 (2013)	PSMA	cáncer de próstata
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a Eph-B2. Abéngozar M et al., Blood 119: 4565-76 (2012)	Eph-B2	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y cáncer de próstata
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a endoglina. Völkel T et al., Biochim Biophys Res Acta 1663: 158-66 (2004)	Endoglina	varios cánceres, tales como cáncer de mama y cánceres colorectales
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a FAP. Zhang J et al., FASEB J 27: 581-9 (2013)	FAP	varios cánceres, tales como sarcomas y cánceres de hueso
anticuerpo o anticuerpos y scFv de unión a CEA Neumaier M et al., Cancer Res 50: 2128-34 (1990); Pavoni E et al., BMC Cancer 6: 4 (2006); Yazaki P et al., Nucl Med Biol 35: 151-8 (2008); Zhao J et al., Oncol Res 17: 217-22 (2008)	CEA	varios cánceres, tales como cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón y cáncer de mama
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD24. Kristiansen G et al., Lab Invest 90: 1102-16 (2010)	CD24	varios cánceres, tales como bladder cancer
scFv de unión a antígenos de Lewis Y. Power B et al., Protein Sci 12: 734-47 (2003); monoclonal antibody BR96 Feridani A et al., Cytometry 71: 361-70 (2007)	antígenos de Lewis Y	varios cánceres, tales como cáncer de cuello de útero y cáncer uterino
adalimumab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis en placas, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, enfermedad hemolítica del recién nacido

afelimomab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios
ald518	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
anrukinzumab o ima-638	IL-13	varios cánceres y trastornos inmunitarios
briakinumab	IL-12, IL-23	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como psoriasis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino esclerosis múltiple
brodalumab	IL-17	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedades inflamatorias
canakinumab	IL-1	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
certolizumab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedad de Crohn
fezakinumab	IL-22	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, psoriasis
ganitumab	IGF-I	varios cánceres
golimumab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante
infliximab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriática, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa
ixekizumab	IL-17A	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedades autoinmunes
mepolizumab	IL-5	varios trastornos inmunitarios y cánceres, tales como cánceres de células B
nerelimomab	TNF- α	varios cánceres y trastornos inmunitarios
olokizumab	IL6	varios cánceres y trastornos inmunitarios
ozoralizumab	TNF- α	inflamación
perakizumab	IL17A	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis
placulumab	TNF humano	varios trastornos inmunitarios y cánceres
sarilumab	IL6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante
siltuximab	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios,
sirukumab	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
tabalumab	BAFF	cánceres de células B
tacilimumab o tremelimumab	CTLA-4	varios cánceres
tildrakizumab	IL23	trastornos inflamatorios mediados inmunológicamente
tnx-650	IL-13	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como cánceres de células B
tocilizumab o atlizumab	receptor de IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
ustekinumab	IL-12, IL-23	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como esclerosis múltiple, psoriasis, artritis psoriática
Varios factores de crecimiento: VEGF, EGF1, EGF2, FGF	VEGFR, EGFR, FGFR	varios cánceres, tales como cáncer de mama y cáncer de colon, y para inhibir la vascularización
Varias citoquinas: IL-2, IL-6, IL-23, CCL2, BAFFs, TNFs, RANKL	IL-2R, IL-6R, IL23R, CD80/CD86, TNFRSF13/TNFRSF17, TNFR	varios trastornos inmunitarios y cánceres
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes. Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012)	Antígeno de la superficie de la gripe (por ejemplo, hemaglutininas y proteína de matriz 2)	infecciones virales

Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes. Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012)	Antígenos de la superficie de coronavirus	de la de	infecciones virales
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes. Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012)	Antígenos de la superficie de henipavirus	de la de	infecciones virales

Listado de secuencias		
Número ID	Descripción del texto	Secuencia biológica
SEQ ID NO: 1	Subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSDNL FAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS HSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAE ALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASRVARMASDEFPSMCP ADGRVRGITHNKILWDSSTLGAIL MRRTISS
SEQ ID NO: 2	Subunidad A de la toxina Shiga (StxA)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDN LFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVE RNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLM SHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTA EALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSY VMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDY HGQDSVRVGRISFGSINAILGSA LILNCHHHASRVARMASDEFPSM CPADGRVRGITHNKILWDSSTLGA ILMRRTISS
SEQ ID NO: 3	Subunidad A de la toxina similar a Shiga 2 (SLT-2A)	DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAIS TPLGNISQGGVSVSVINHLVGGNY ISLNVRLDPYSERFNHLRLIMER NNLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIADL ERTGMQIGRHSLVGSYLDLMEFR GRSMTRASSRAMLRFVTVIAEAL RFRQIQRGFRPALSEASPLYTMTA QDVDLTLNWGRISNVLPPEYRGEE GVRIGRISFNLSAILGSVAVILNC HSTGYSVRSVSQKQKTECQIVGD RAAIKVNNVLWEANTIAALLNRK PQDLTEPNQ

SEQ ID NO: 4	SLT-1A desinmunizado (K1M)	MEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNL FAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS HSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAE ALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASRVAR
SEQ ID NO: 5	SLT-1A desinmunizado (S8I)	KEFTLDFITAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 6	SLT-1A desinmunizado (T9I)	KEFTLDFSIKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 7	SLT-1A desinmunizado (K11A)	KEFTLDFSTAATYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 8	SLT-1A desinmunizado (S33I)	

		<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISIGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
SEQ ID NO: 9	SLT-1A desinmunizado (S45I)	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
SEQ ID NO: 10	α SLT-1A desinmunizado (D53A)	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVAVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>

SEQ ID NO: 11	SLT-1A (R55A) desinmunizado	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVAGIDPEEGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
SEQ ID NO: 12	SLT-1A (D58A) desinmunizado	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL</p> <hr/> <p>RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
SEQ ID NO: 13	SLT-1A (D58F) desinmunizado	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIFPEEGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>

<p>SEQ ID NO: 14</p>	<p>SLT-1A desinmunizado (P59A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDAEEGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 15</p>	<p>SLT-1A desinmunizado (E60I)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPIEGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 16</p>	<p>SLT-1A desinmunizado (E60R)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPREGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ</p> <hr/> <p>DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>

<p>SEQ ID NO: 17</p>	<p>SLT-1A desinmunizado (E61A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEAGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDL SGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 18</p>	<p>SLT-1A desinmunizado (G62A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEARFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDL SGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 19</p>	<p>SLT-1A desinmunizado (D94A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFAAFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDL SGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>

SEQ ID NO: 20	SLT-1A (S96I) desinmunizado	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFIHV TFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHS GTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 21	SLT-1A (G110A) desinmunizado	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTALSADSSYTTLQ RVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 22	SLT-1A (G147A) desinmunizado	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQ RVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR

SEQ ID NO: 23	SLT-1A (R179A) desinmunizado	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFATTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 24	SLT-1A (D183A) desinmunizado	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLADLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 25	SLT-1A (D184A) desinmunizado	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDALSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 26	SLT-1A (D184F) desinmunizado	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDFLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR

SEQ ID NO: 27	SLT-1A desinmunizado (D186A)	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
SEQ ID NO: 28	SLT-1A desinmunizado (G187A)	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSARSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
SEQ ID NO: 29	SLT-1A desinmunizado (R188A)	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
SEQ ID NO: 30	SLT-1A desinmunizado (S189A)	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGRAYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>

<p>SEQ ID NO: 31</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (R205A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGALSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 32</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (K1M, K11A)</p>	<p>MEFTLDFSTAATYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNL FAVDVRGIDPEEGRFNNLRLLIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS HSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAE ALRFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 33</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (S45I, R188A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGASYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 34</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (E60I, G110A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPIEGRFNNLRLLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>

SEQ ID NO: 35	SLT-1A desinmunizado (E60I, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPIEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 36	SLT-1A desinmunizado (D94A, S96I)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFAAFIHV TFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHS GTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 37	SLT-1A desinmunizado (S33I, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 38	SLT-1A desinmunizado (S45I, G110A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR

SEQ ID NO: 39	SLT-1A desinmunizado (D58A, G100A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDL SGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 40	SLT-1A desinmunizado (E60I, G100A, G147A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPIEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDL SGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 41	SLT-1A desinmunizado (D183A, D184A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLAALSGASYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 42	SLT-1A desinmunizado (D58A, G110A, G147A, S186A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFR TTLDDL AGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR

<p>SEQ ID NO: 43</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (D58A, G110A, G147A, G187A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDDLSARSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 44</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (D58A, G110A, G147A, R188A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 45</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (D58A, G110A, G147A, S189A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDDLSGRAYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 46</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (S45I, D58A, E60I, G110A, G147A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIAPIEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>

<p>SEQ ID NO: 47</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (D58A, G110A, G147A, S186A, R188A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDL GASYVMT AEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 48</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (D58A, G110A, G147A, G187A, R188A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLF AVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDL SAASYVMT AEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 49</p>	<p>SLT-1A desimmunizado (S33I, S45I, D58A, G110A, G147A)</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLFA</p> <hr/> <p>VDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERN LYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHV TFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHS ATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRTTLDDL SGRSYVMT AEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR</p>

SEQ ID NO: 50	SLT-1A desinmunizado (S45I, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITTLAALSGASYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 51	SLT-1A desinmunizado (S45I, D58A, E60I, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIAPIEGRFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITTLAALSGASYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 52	SLT-1A desinmunizado (S45I, D58A, E60I, G62A, G110A, G147A, D183A, D184A, R188A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIG TPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLF AVDVRGIAPIEARFNNLRLIVERN NLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSH VTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSH SATSLTQSVARAMLRFVTVTAEAL RFRQIQRGFRITTLAALSGASYVMT AEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQ DSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASRVAR
SEQ ID NO: 53	Proteína citotóxica: α CD20 fusionado con SLT-1A desinmunizado, variante 1	MQVQLQQPGAELVKPGASVKMS CKTSGYTFTSYNVHWVKQTPGQG LEWIGAIYPGNGDTSFNQKFKGKA TLTADKSSSTVYMQLSSTSEDSA

		<p>VYYCARSNYYGSSYVWFFDVWG AGTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGS QIVLSQSPPTILSASPGEKVTMTCRA SSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWIY ATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSL TISRVEAEDAATYYCQQWISNPPT FGAGTKLELKEFPKPSTPPGSSGG APKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISIGGTSLLMIDSGIGDN LFAVDVRGIAPEEGRFNNRLIVE RNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLM SHSATSLTQSVARAMLRFVTVTAE ALRFRQIQRGFRTTDDLSGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASAVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 54</p>	<p>Proteína citotóxica: αCD20 fusionado con SLT-1A desinmunizado, variante 2</p>	<p>MQVQLVQSGAELVKPGASVKMS CKASGYTFTSYNMHWVKQTPGQ GLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCARAQLRPNYWYFDVWG AGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGG SGGGGSGGGGSDIVLSQSPAILSAS PGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQ QKPGSSPKPWIYATSNLASGVPAR FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATY YCQQWISNPPTFGAGTKLELKGG GGSGGKEFTLDFSTAKTYVDSLNV IRSAIGTPLQTISIGGTSLLMIDSGIG DNLFAVDVRGIAPEEGRFNNRLI VERNLYVTGFVNRTNNVFYRFA DFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTL QRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGR SYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLP DYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNCHHHASAVAR</p>

<p>SEQ ID NO: 55</p>	<p>Proteína citotóxica: αCD20 fusionado con SLT-1A desinmunizado, variante 3</p>	<p>MQVQLQQPGAELVKPGASVKMS CKASGYTFTSYNMHWVKQTPGR GLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKG KATLTADKSSSTAYMQLSSLTSED SAVYYCARSTYYGGDWYFNVWG AGTTVTVSAGSTSGSGKPGSGEGS TKGQIVLSQSPAILSASPGEKVTMT CRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPW IYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYS LTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPP TFGGGTKLEIKEFPKPSTPPGSSGG APKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISIGGTSLLMIDSGIGDN LFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVE RNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLM SHSATSLTQSVARAMLRFVTVTAE ALRFRQIQRGFRTTLDDL SGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASAVAR</p>
----------------------	---	---

<p>SEQ ID NO: 56</p>	<p>Proteína citotóxica: αCD20 fusionado con SLT-1A desimmunizado, variante 4</p>	<p>MQVQLQQPGAELVKPGASVKMS CKTSGYTFTSYNVHWVKQTPGQG LEWIGAIYPGNGDTSFNQKFKGKA TLTADKSSSTVYMQLSLTSSEDA VYYCARSNYYGSSYVWFFDVWG AGTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGS QIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRA SSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWIY ATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSL TISRVEAEDAATYYCQQWISNPPT FGAGTKLELKEFPKPSTPPGSSGG APGILGFVFTLKEFTLDFSTAKTYV DSLNVIRSAIGTPLQTISIGGTSLLM IDSGIGDNLFAVDVRGIAPEEGRFN NLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVF YRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTT SYLDLMSHSATSLSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDL LSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLS SVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAI LGSVALILNCHHHASAVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 57</p>	<p>Proteína citotóxica: anti- HER2-V_H fusionado con SLT-1A desimmunizado, variante 1</p>	<p>MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQRE LVALISSIGDTYYADSVKGRFTISR DNAKNTVYVYLMNSLKPEDTAVY YCKRFRTAAQGTDYWGQGTQVT VSSAHHSEDPSSKAPKAPKEFTLD FSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTI SIGGTSLLMIDSGIGDNLFAVDVR</p> <hr/> <p>GIAPEEGRFNNLRLIVERNNLYVT GFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGT TAVTLSADSSYTTLQRVAGISRTG MQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLS QSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQ RGFRTTLDLSDGRSYVMTAEDVD LTLNWGRLLSVLPDYHGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SAVAR</p>

<p>SEQ ID NO: 58</p>	<p>Proteína citotóxica: anti-HER2-V_HH fusionado con SLT-1A desinmunizado, variante 2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSA IGTPLQTISIGGTSLLMIDSGIGDNL FAVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS HSATSLTQSVARAMLRFVTVTAE ALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASAVAREFPKPSTPPGSS GGAPMEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGITFSINTMGWYRQAPG KQRELVALISSIGDTYYADSVKGR FTISRDNKNTVYLMNSLKPEDT AVYYCKRFRRTAAQGTDYWGQGT QTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 59</p>	<p>Proteína citotóxica: anti-HER2-V_HH fusionado con SLT-1A desinmunizado, variante 3 (αHER2-V_HH:SLT-1A:KDEL)</p>	<p>MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGITFSINTMGWYRQAPGKQRE LVALISSIGDTYYADSVKGRFTISR DNAKNTVYLMNSLKPEDTAVY YCKRFRRTAAQGTDYWGQGTQVT VSSEFPKPSTPPGSSGGAPKEFTLD FSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTI SIGGTSLLMIDSGIGDNLFAVDVR GIAPEEGRFNNLRLIVERNNLYVT GFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGT TAVTLSADSSYTTLQRVAGISRTG MQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLT QSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQ RGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVD LTLNWGRLLSSVLPDYHGGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHHA SAVARKDEL</p>

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que comprende una región efectora de la toxina Shiga, en el que:
- 5 (i) la región efectora de la toxina Shiga tiene al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje seleccionada de entre:
- los residuos de aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 1,
 los residuos de aminoácidos 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1,
 los residuos de aminoácidos 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1, y
 los residuos de aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1,
- 10 y en el que, en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, la región efectora de la toxina Shiga comprende una sustitución de al menos un residuo de aminoácido en al menos tres regiones de epítipo de la secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga seleccionada del grupo que consiste en: 1-15 de SEQ ID NO: 1; 27-37 de SEQ ID NO: 1; 39-48 de SEQ ID NO: 1; 53-66 de SEQ ID NO: 1; 94-115 de la SEQ ID NO: 1; 141-153 de la SEQ ID NO: 1; 179-190 de la SEQ ID NO: 1; 205 de la SEQ ID NO: 1; 243-257 de la SEQ ID NO: 1; y 254 a 268 de la SEQ ID NO: 1;
- 15 en el que, en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, la región efectora de la toxina Shiga comprende las sustituciones de aminoácidos:
- S33I, G110A y G147A;
 S45I, G110A y G147A;
 20 D58A, G110A y G147A;
 E60I, G110A y G147A;
 D58A, G110A, G147A, y S186A;
 D58A, G110A, G147A y G187A;
 D58A, G110A, G147A, y R188A;
 25 D58A, G110A, G147A, y S189A;
 S45I, D58A, E60I, G110A y G147A;
 D58A, G110A, G147A, S186A, y R188A;
 D58A, G110A, G147A, G187A, y R188A;
 S33I, S45I, D58A, G110A y G147A;
 30 S45I, G110A, G147A, D183A, D184A y R188A;
 S45I, D58A, E60I, G110A, G147A, D183A, D184A y R188A; o
 S45I, D58A, E60I, G62A, G110A, G147A, D183A, D184A y R188A,
 en el que la región efectora de la toxina Shiga tiene una antigenicidad y/o inmunogenicidad reducida en comparación con dicha secuencia de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje; y
- 35 en el que la región efectora de la toxina Shiga es capaz de mostrar una función efectora de toxina Shiga seleccionada entre internalización celular, enrutamiento subcelular, actividad catalítica y citotoxicidad.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que el polipéptido de la región efectora de la toxina Shiga muestra una actividad de inhibición de ribosomas con un valor de IC₅₀ de 10000 picomolar o menos y/o un nivel significativo de actividad catalítica de la toxina Shiga.
- 40 3. Polipéptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la región efectora de la toxina Shiga comprende el polipéptido mostrado en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 37-40 y 42-52.
- 45 4. Una proteína que comprende:
- a) un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y
 b) una región de unión capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular.
- 50 5. Proteína según la reivindicación 4, en la que la región de unión comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
- fragmento de una región determinante de complementariedad 3; polipéptido FR3-CDR3-FR4 restringido, fragmento de anticuerpo de un solo dominio, fragmento variable de cadena única, fragmento variable de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, fragmento Fd, 10^o dominio de tipo III de fibronectina derivado de fibronectina, dominio de tipo III de tenascina, dominio del motivo de repetición de anquirina, dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad, lipocalina, dominio Kunitz, dominio Z derivado de Proteína A, dominio derivado de gamma B cristalina, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d, dominio SH2 derivado de Fyn, miniproteína, andamios estructurales de dominio similar a lectina de tipo C, mimético de anticuerpo manipulado y cualquier homólogo genéticamente manipulado de cualquiera de los anteriores que retenga la funcionalidad de unión.
- 55 6. Proteína según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que tras la administración de la proteína a una célula acoplada físicamente con biomoléculas diana extracelulares de la región de unión, la proteína es capaz de causar la muerte de la célula;
- 60 opcionalmente en el que tras la administración de la proteína a una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente a dichas biomoléculas diana extracelulares, y una segunda población de células cuyos miembros no están acoplados físicamente a ninguna de dichas biomoléculas diana extracelulares, el efecto citotóxico
- 65

de la proteína con respecto a miembros de dicha primera población de células con respecto a los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor.

- 5 7. Proteína según la reivindicación 6, en la que dicha célula o primera población de células se acopla físicamente con una biomolécula diana extracelular por medio de interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan la biomolécula diana extracelular, o una porción de la misma, al exterior de una célula; o en la que dicha biomolécula diana extracelular es una proteína integral de membrana o proteína de membrana periférica expresada por la célula o primera población de células.
- 10 8. Proteína según la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que la proteína muestra una citotoxicidad con un valor CD_{50} de 1.000 nanomolar o menos.
- 15 9. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en la que la región de unión es capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en:
 CD20, CD22, CD40, CD74, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, CDCP1, endoglina, proteína activada por fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, EpCAM, CEA, gpA33, mucina, TAG-72, anhidrasa carbónica IX, proteína de unión a folato, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido Lewis-Y2, VEGFR, Alfa Vbeta3, Alfa5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, beta-catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART-1/MelanA, gp100, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus de Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfa-fetoproteína, 17-A1, antígeno de tumor de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FceRIa, galectina-9, mrp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, CD193, TLR4, FceRIa, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, CD11a-c, GITRL, MHC Clase II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2, CD11c, y cualquier fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores.
- 20 10. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, que comprende o que consiste en el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, o SEQ ID NO: 59.
- 25 11. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en la que la región efectora de la toxina Shiga del polipéptido comprende una mutación con relación a una subunidad A natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia la actividad enzimática de la región efectora de la toxina Shiga, la mutación seleccionada entre al menos una eliminación o sustitución de residuo de aminoácido.
- 30 12. Proteína según la reivindicación 11, en la que la mutación reduce o elimina la citotoxicidad.
- 35 13. Proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-12, unida a un material exógeno adicional seleccionado de uno cualquiera de: péptido, proteína, agente promotor de la detección, agente quimioterapéutico de molécula pequeña, y polinucleótido.
- 40 14. Proteína según la reivindicación 13, en la que el material exógeno adicional es un péptido o proteína que comprende un antígeno.
- 45 15. Polinucleótido que codifica un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-12, o un complemento de cualquiera de los anteriores.
- 50 16. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 15.
- 55 17. Célula huésped que comprende un polinucleótido según la reivindicación 15 o vector de expresión según la reivindicación 16.
- 60 18. Composición farmacéutica que comprende un polipéptido desinmunizado según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 65 19. Composición farmacéutica según la reivindicación 18, en la que el al menos un portador farmacéuticamente aceptable incluye un disolvente, medio de dispersión, recubrimiento, tal como lecitina, agente antimicrobiano, agente isotónico, o agente retardante de la absorción; y/o en la que la composición farmacéutica comprende además un portador acuoso o no acuoso; un tensioactivo; un estabilizador, conservante, tampón, antioxidante, agente humectante, agente emulsionante; y/o un agente antibacteriano o antifúngico.

20. Composición de diagnóstico que comprende una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, y un agente promotor de la detección.
- 5 21. Procedimiento in vitro para destruir una célula, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-14.
- 10 22. Procedimiento in vitro de administración de un material en una célula, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una proteína según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que la célula se acopla físicamente con dicha biomolécula diana extracelular;
opcionalmente en el que la célula se acopla físicamente con dicha biomolécula diana extracelular por medio de interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan la biomolécula diana extracelular, o una porción de la misma, al exterior de una célula; o en el que dicha biomolécula diana extracelular es una proteína integral
15 de membrana o proteína de membrana periférica expresada por la célula.
23. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, o composición farmacéutica según la reivindicación 18 o 19, para uso como medicamento.
- 20 24. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, o composición farmacéutica según la reivindicación 18 o 19, para usar en el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, anormalidad de crecimiento, trastorno inmune, o infección microbiana;
opcionalmente en el que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en: cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular,
25 cáncer de cabeza-cuello, cáncer hematológico, cáncer de riñón-tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer de útero, o en el que el trastorno inmune está asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, y vasculitis.
- 30 25. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, o una composición de diagnóstico según la reivindicación 20, en el diagnóstico, pronóstico, o la caracterización in vitro de una enfermedad, trastorno o afección.
- 35 26. Kit que comprende:
(i) un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3,
(ii) una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 4-14,
40 (iii) una composición farmacéutica según la reivindicación 18 o 19,
(iv) una composición de diagnóstico según la reivindicación 20,
(v) un polinucleótido según la reivindicación 15,
(vi) un vector de expresión según la reivindicación 16, o
(vii) una célula huésped según la reivindicación 17,
45 y un reactivo y/o dispositivo de administración farmacéutica adicionales.

Figura 1. Diagrama esquemático de la arquitectura general de polipéptidos y proteínas citotóxicas de ejemplo

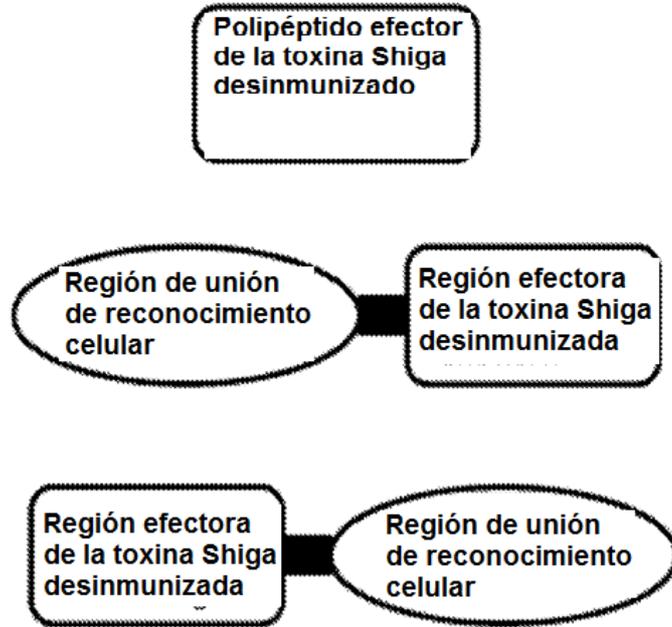
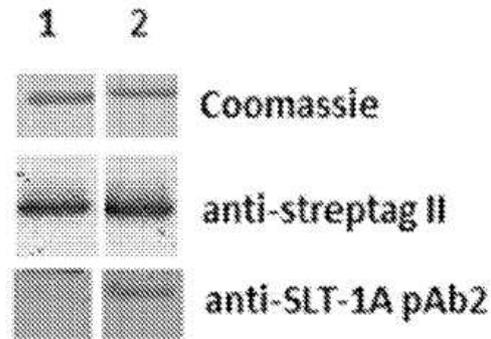
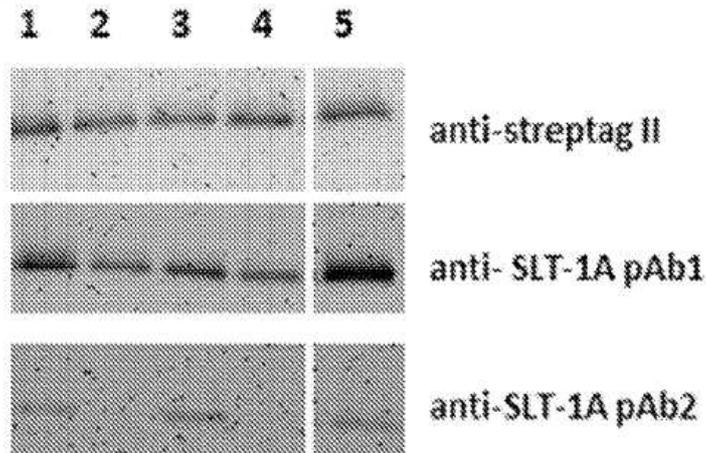


Figura 2: Análisis de transferencia Western de polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado; una proteína que comprende la alteración de epítipo D58A no fue reconocida por el anticuerpo pAb2



1. D58A SLT-1A
2. SLT-1A de tipo salvaje

Figura 3. Análisis de transferencia Western de polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados



1. S45I, G110A, G147A
2. D58A, G110A, G147A
3. S33I, G110A, G147A
4. S33I, S45I, D58A, G110A, G147A
5. SLT-1A de tipo salvaje

Figura 4. Análisis de transferencia Western de polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados

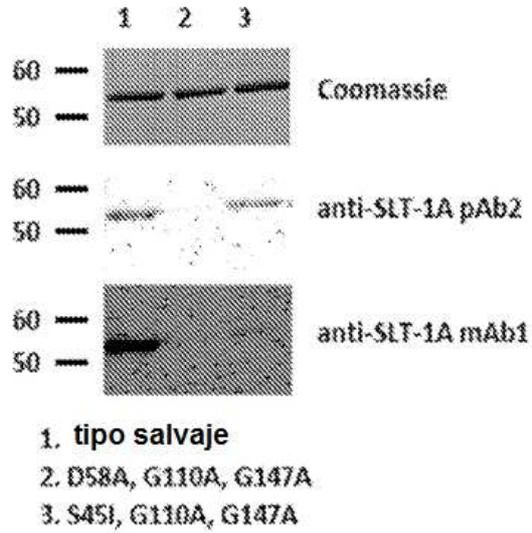


Figura 5. Análisis de transferencia Western de polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados

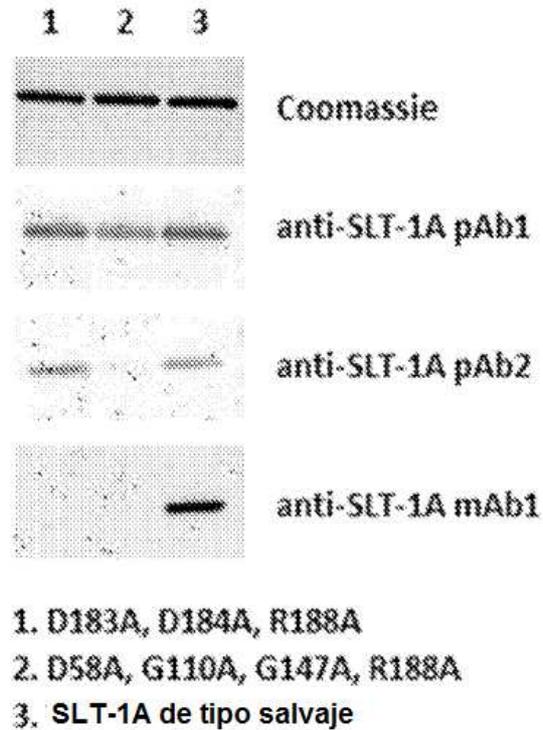


Figura 6. Análisis ELISA de polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados

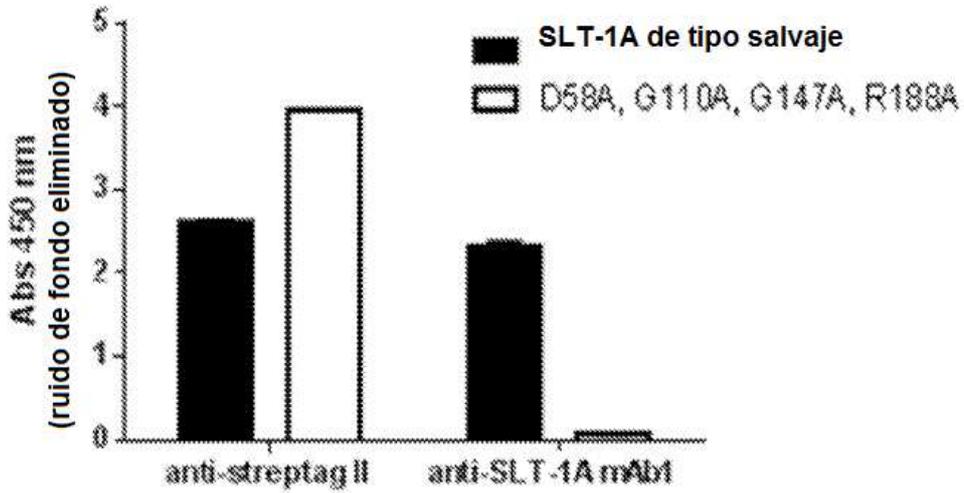


Figura 7. Respuestas de anticuerpos anti-proteína citotóxica in vivo relativa: Comparación de una proteína citotóxica de la invención que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado con respecto a una proteína citotóxica que comprende una región efectora de la toxina Shiga de tipo salvaje

