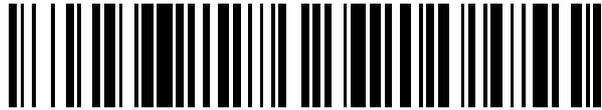


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 302**

51 Int. Cl.:

C07K 14/38 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2014 PCT/US2014/020035**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14158770**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2014 E 14775634 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2971038**

54 Título: **Moléculas de ribotoxina derivadas de sarcina y otras ribotoxinas fúngicas relacionadas**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361783589 P

12.11.2013 US 201361902972 P

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

08.06.2020

73 Titular/es:

**RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES,
INC. (100.0%)**

**6440 N. Swan Road, Suite 200
Tucson, AZ 85718, US**

72 Inventor/es:

GEHLSSEN, KURT, R.;
JONES, TIMOTHY, DAVID;
CARR, FRANCIS, JOSEPH y
HEARN, ARRON

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 765 302 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

Moléculas de ribotoxina derivadas de sarcina y otras ribotoxinas fúngicas relacionadas

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio y se basa en la fecha de presentación de la solicitud de patente provisional de los EEUU. número 61/902.972, presentada el 12 de noviembre de 2013, y la solicitud de patente provisional de los EE.UU. número 61/783.589, presentada el 14 de marzo de 2013.

10

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato ASCII y se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia en ASCII, creada el 27 de febrero de 2014, se llama 0185.0001-PCT_SL.txt y tiene un tamaño de 42.413 bytes.

15

Antecedentes

La α -sarcina fue una de las primeras ribotoxinas que se descubrió como producto del moho *Aspergillus giganteum* MDH18894 en 1965. Su nombre se debe a su toxicidad para determinadas estirpes celulares de sarcoma. Más tarde, a mediados de la década de 1970, se determinó que esta toxicidad se debía a una escisión específica por la toxina de un determinado segmento de ARN ribosómico (el bucle de sarcina-ricina) conservado en todo el reino animal. La escisión de ese ARN ribosómico por la toxina inhibe la producción de proteínas por la célula. Es altamente tóxica, que destruye células a través de un mecanismo apoptótico.

20

25

La α -sarcina es una proteína de 150 aminoácidos (Lacadena et al., 2007, *FEMS Microbiol Rev* 31, 212-237). Se sabe mucho acerca de la estructura de la α -sarcina. Tyr48, His50, Glu96, Arg121, His137 y Leu145 son aminoácidos fundamentales para el sitio activo de la actividad ARNasa. La lámina beta de cinco cadenas y la hélice α simple son importantes para la estructura 3D de la molécula. La proteína contiene dos enlaces disulfuro. La mayor parte de la variación natural entre la α -sarcina y las moléculas de organismos relacionados reside en los bucles entre estos elementos estructurales. La supresión de los aminoácidos 7-22 no parece afectar a la conformación de la proteína. (Sin embargo, sí afectó a la interacción de la membrana). La molécula está altamente cargada negativamente con un punto isoeléctrico alto. Los aminoácidos 116 - 139 pueden estar implicados en las interacciones de la membrana celular, tales como el cruce de la membrana celular. Asn54 puede estar implicada en el bolsillo de unión para el sustrato. Arg121 puede ser fundamental para la interacción con membranas lipídicas. La inmunogenia de la sarcina no se ha estudiado bien.

30

35

Otras ribotoxinas fúngicas pertenecen a la misma familia que la α -sarcina y son producidas por otras especies de *Aspergillus*, incluyendo, por ejemplo, clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina. Los miembros de esta familia de ribotoxinas comparten un alto grado de identidad de aminoácidos, generalmente superior al 85 %. (Lacadena et al., 2007, *FEMS Microbiol Rev* 31, 212-237) y median la toxicidad a través del mismo mecanismo, es decir, mediante la escisión de un enlace fosfodiéster en el bucle de sarcina-ricina conservado de ARN ribosómico. La clavina y la gigantina tienen 150 aminoácidos de longitud, mientras que la restrictocina y la mitogilina, que son variantes del mismo polipéptido aislado de *A. restrictus*, tienen 149 aminoácidos de longitud.

40

45

Alford et al., *BMC Biochemistry* 2009, 10:9, 1-11, describió mutantes de alfa-sarcina R121Q y H137Q.

El documento EP 0 524 768 desvela mutantes de alfa-sarcina, que incluyen un análogo que tiene la mutación K14C.

50

García-Ortega et al., *J. Biol. Chem.* 2002, 277:18632-18639 desvela la supresión N-terminal de los restos de aminoácidos 7-22 en la alfa-sarcina.

La entrada de la base de datos UniProt P87063 (*Aspergillus giganteus*) desvela una gigantina que presenta una identidad del 94 % sobre 150 aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 y que tiene ácido glutámico en la posición 9, arginina en la posición 139 e isoleucina en la posición 13.

55

La entrada de la base de datos UniProt 013324 (*Penicillium digitatum*) desvela una alfa-sarcina que presenta una identidad del 94,7 % en un solapamiento de 150 aminoácidos con la SEQ ID NO: 1 y que tiene tirosina en la posición 134.

60

La entrada de la base de datos UniProt 013322 (*Penicillium resedanum*) desvela una alfa-sarcina que presenta una identidad del 94,7 % con la SEQ ID NO: 1 en un solapamiento de 150 aminoácidos y que tiene una lisina en la posición 16.

65 **Sumario**

Brevemente, la presente divulgación presenta epítomos de ribotoxina modificados de las ribotoxinas fúngicas, incluyendo α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina, por ejemplo, "epítomos de ribotoxina modificados". Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría o mecanismo, se cree que los epítomos de ribotoxina modificados que se desvelan en la presente solicitud poseen una unión reducida al CMH humano de clase II y/o desencadenan una respuesta de linfocitos T reducida en comparación con los epítomos de ribotoxina de tipo silvestre correspondientes.

La invención se refiere a un polipéptido de sarcina modificado que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, excepto al menos una mutación, en donde la al menos una mutación está en uno o más de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre y está dentro de un primer epítomo de linfocitos T y/o está en uno o más de los aminoácidos K139, E140 o Q142 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre y está dentro de un segundo epítomo de linfocitos T del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde el primer epítomo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo epítomo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y en donde el polipéptido de sarcina modificado inhibe la síntesis de proteínas y desencadena una respuesta de linfocitos T reducida en comparación con el polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde la inhibición de la síntesis de proteínas se mide usando un ensayo de transcripción y traducción *in vitro* (TTIV) y en donde la respuesta de linfocitos T reducida se refiere a un índice de estimulación (IE) inferior a 1,5 medido mediante un ensayo de proliferación de linfocitos T *in vitro* (incorporación de 3{H}-timidina) usando células mononucleares de sangre periférica humana empobrecidas en CD8+.

La invención también se refiere a un polipéptido de sarcina modificado para su uso en la inhibición de la síntesis de proteínas y el desencadenamiento de una respuesta de linfocitos T reducida en comparación con el polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde el polipéptido de sarcina modificado tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, excepto al menos una mutación, en donde la al menos una mutación está en uno o más de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre y está dentro de un primer epítomo de linfocitos T y/o está en uno o más de los aminoácidos K139, E140 o Q142 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre y está dentro de un segundo epítomo de linfocitos T del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde el primer epítomo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y el segundo epítomo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

La invención se refiere adicionalmente a una composición que comprende el polipéptido de sarcina modificado anterior y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, o una proteína de fusión que comprende dicho polipéptido de sarcina modificado conjugado o fusionado con una molécula de direccionamiento. La molécula de direccionamiento puede ser un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

La invención se refiere adicionalmente a un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de sarcina modificado o la proteína de fusión anteriores, un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico o una célula hospedadora transformada con dicho vector de expresión.

Por último, la invención se refiere a un método de producción del polipéptido de sarcina modificado o la proteína de fusión anteriores, que comprende cultivar la célula hospedadora anterior y purificar dicho polipéptido de sarcina modificado o la proteína de fusión expresados a partir de dicha célula hospedadora.

En una realización de ejemplo, el epítomo de linfocitos T modificado comprende una o más modificaciones de aminoácidos de un epítomo de linfocitos T de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de XKNPKTNKY (SEQ ID NO: 44), en donde X es Q o DQ. En otra realización de ejemplo, el epítomo de linfocitos T modificado comprende una o más modificaciones de aminoácidos de un epítomo de linfocitos T de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de IIAHTKENQ (SEQ ID NO: 4).

La presente divulgación también presenta moléculas modificadas basadas en la estructura de las ribotoxinas fúngicas, incluyendo α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina, por ejemplo, "moléculas de ribotoxina modificadas". Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría o mecanismo, se cree que las moléculas de ribotoxina modificadas de la presente divulgación son menos inmunógenas para los seres humanos en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre. La eficacia de una molécula puede estar limitada por una respuesta inmunitaria no deseada, en particular si la molécula se usa en un entorno terapéutico o profiláctico. Por tanto, en determinados casos puede ser deseable reducir la inmunogenia de una molécula.

Una "realización" o "aspecto" como se usan en lo sucesivo en el presente documento se refieren a una realización o aspecto que se desvelan en el presente documento, o una realización o aspecto que se desvelan y se reivindican en el presente documento.

En una realización de ejemplo, el polipéptido de sarcina modificado comprende al menos una mutación en comparación con un polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en donde la al menos una mutación está dentro de un primer epítomo de linfocitos T y/o un segundo epítomo de linfocitos T del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde el primer epítomo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos XKNPKTNKY (SEQ ID NO: 44), en donde X es Q o DQ y el segundo epítomo de linfocitos T consiste en la secuencia de

aminoácidos IIAHTKENQ (SEQ ID NO: 4).

La presente divulgación también presenta proteínas de fusión que comprenden moléculas de ribotoxina modificadas (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina) y moléculas de direccionamiento. Las moléculas de direccionamiento pueden incluir, pero sin limitación, anticuerpos, fragmentos Fab, fragmentos variables monocatenarios (scFv), dominios VH, dominios CH2 modificados por ingeniería genética, péptidos, citocinas, hormonas, otros almacenones de proteínas, etc. Las proteínas de fusión pueden usarse como agentes terapéuticos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las proteínas de fusión se dirigen a un patógeno o una célula cancerosa no deseados. Por tanto, determinadas realizaciones se refieren a métodos de uso de una proteína de fusión que comprende una molécula de ribotoxina modificada para tratar o controlar una enfermedad o afección.

Otro aspecto se refiere a construcciones de ácido nucleico que codifican las moléculas de ribotoxina modificadas (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina) o proteínas de fusión que comprenden las mismas. Las construcciones de ácido nucleico pueden usarse, por ejemplo, en un método de producción de la molécula de ribotoxina modificada o la proteína de fusión mediante la expresión de la construcción de ácido nucleico en una célula hospedadora y el aislamiento de la molécula de ribotoxina modificada o la proteína de fusión.

Son evidentes ventajas y aspectos adicionales de la presente invención en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

Los dibujos adjuntos, que se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención y se incorporan y constituyen una parte de la presente memoria descriptiva, ilustran aspectos de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención. En los dibujos:

La **Figura 1** muestra una comparación de la frecuencia de alotipos donadores expresados en la cohorte del estudio RCT02 (n = 52) y las poblaciones mundial, europea y norteamericana.

La **Figura 2** muestra los resultados del ensayo EpiScreen™, que somete a ensayo 46 péptidos pentadecaméricos solapados por 12 aminoácidos que abarcan la secuencia de sarcina y dos conjuntos de 5 péptidos que abarcan mutantes nulos E96Q y H137Q. Cada péptido se sometió a ensayo en cultivos sextuplicados y los datos se presentaron como no ajustados en la Figura 2A (todas las réplicas) o ajustados en la Figura 2B (menos valores atípicos). Los péptidos se consideraron positivos cuando el número de donadores que respondieron (IE>2) fue superior a la respuesta promedio para el conjunto de datos completo más 2xDT (6,6 % en ambos conjuntos de datos).

La **Figura 3** muestra epítomos identificados mediante el cartografiado de epítomos de linfocitos T EpiScreen™ de toxina α -sarcina y variantes de aminoácidos únicos. A) Epítomo 1 (restos 10-18) y (la Figura 3A desvela las SEQ ID NO 51 y 53, respectivamente, en orden de aparición, y sus secuencias mutantes correspondientes como las SEQ ID NO 52 y 54, respectivamente) B) Epítomo 2 (restos 134-142) (la Figura 3B desvela las SEQ ID NO 55 y 57, respectivamente, en orden de aparición, y sus secuencias mutantes correspondientes como las SEQ ID NO 56 y 58, respectivamente).

La **Figura 4** muestra el análisis de la expresión de variantes de epítomo doble de α -sarcina mediante transferencia Western anti-His de fracciones solubles (S) e insolubles (I) después de la extracción con B-Per. El marcador de tamaño es un patrón de proteína preteñido Fermentas PageRuler (N.º de catálogo SM1811).

La **Figura 5** muestra los resultados de un ensayo de TTIV usando extractos solubles que contienen α -sarcina de tipo silvestre, mutante nulo de α -sarcina H137Q y diversos mutantes dobles de α -sarcina.

La **Figura 6** muestra los resultados de un ensayo de TTIV usando plásmidos que codifican α -sarcina de tipo silvestre, mutante nulo de α -sarcina (H137Q) y variantes triples/cuádruples de α -sarcina.

La **Figura 7** muestra el análisis de la expresión de proteínas de variantes triples de α -sarcina. La Figura 7A es una transferencia Western anti-His de fracciones solubles (S) e insolubles (I) después de la extracción con B-Per. La Figura 7B es un gel SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de variantes His-purificadas.

La **Figura 8** muestra los resultados de un ensayo de TTIV usando proteína purificada para α -sarcina de tipo silvestre, mutante nulo de α -sarcina (H137Q) y variantes triples de α -sarcina.

La **Figura 9** muestra los resultados de un ensayo de citotoxicidad celular (Jurkat) usando α -sarcina de tipo silvestre, mutante nulo de α -sarcina (H137Q) y variantes triples de α -sarcina.

Definiciones

Con el fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de la invención, se proporcionan las siguientes

explicaciones de términos específicos:

Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular, biología celular e inmunología en *Kuby Immunology*, Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara Anne Osborne, Janis Kuby, publicado por W.H. Freeman, 2007 (ISBN 1429202114); y *Genes IX*, Benjamin Lewin, publicado por Jones & Bartlett Publishers, 2007 (ISBN-10: 0763740632).

Anticuerpo: Una proteína (o complejo) que incluye uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina pueden incluir los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras pueden clasificarse como kappa o lambda. Las cadenas pesadas pueden clasificarse como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpos" incluye inmunoglobulinas intactas, así como fragmentos (por ejemplo, que tienen un peso molecular entre aproximadamente 10 kDa y 100 kDa). Los fragmentos de anticuerpos pueden incluir: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo producida mediante digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenida tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo obtenido tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; (4) F(ab')₂, un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos por dos enlaces disulfuro; (5) Fv, un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; y (6) scFv, anticuerpo monocatenario, una molécula modificada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unida por un enlazador de polipéptido adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada. Los métodos para preparar fragmentos de anticuerpos son rutinarios (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1999). Los fragmentos de anticuerpos no se limitan a los ejemplos mencionados anteriormente, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede incluir un V_H, unV_L, etc.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse a partir de una diversidad de métodos, por ejemplo, métodos que implican la presentación de fagos y bibliotecas de anticuerpos humanos. Se describen ejemplos de procedimientos para la producción de anticuerpos monoclonales en Longberg y Huzar (*Int Rev Immunol.*, 1995, 13:65-93), Kellermann y Green (*Curr Opin Biotechnol.*, 2002, 13:593-7) y Harlow y Lane (*Using Antibodies: A Laboratory Manual*, CSHL, Nueva York, 1999). Se analizan métodos clásicos de preparación de hibridomas murinos en Kohler y Milstein (*Nature* 256:495-97, 1975).

Una inmunoglobulina "humanizada" convencional, tal como un anticuerpo humanizado, es una inmunoglobulina que incluye una región marco conservada humana y una o más CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, de ratón, de rata, sintética, etc.). Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno o a uno similar que el anticuerpo donador que proporciona las CDR. Las moléculas pueden construirse por medio de ingeniería genética (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.585.089).

Antígeno: Un compuesto, composición o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T, incluyendo las composiciones que se inyectan o se absorben. Un antígeno (Ag) reacciona con los productos de inmunidad humoral o celular específica. En algunas realizaciones, un antígeno también puede ser la diana de unión específica de la molécula de sarcina modificada y/o la proteína de fusión de ribotoxina (por ejemplo, restos de unión) independientemente de que dicha interacción pueda producir una respuesta inmunitaria.

Avidez: afinidad de unión (por ejemplo, aumentada) como resultado de sitios de unión bivalentes o multivalentes que pueden unirse simultáneamente a un antígeno o receptor diana multivalente que es en sí mismo multimérico o está presente en la superficie de una célula o virus de manera que pueda organizarse en una forma multimérica. Por ejemplo, los dos brazos Fab de una inmunoglobulina pueden proporcionar dicho aumento de avidéz para un antígeno en comparación con la unión de un solo brazo Fab, puesto que ambos sitios deben estar libres para que se disocie la inmunoglobulina.

Afinidad de unión: la fuerza de unión entre un sitio de unión y un ligando (por ejemplo, entre un resto de unión, por ejemplo, un anticuerpo, y un antígeno o epítipo). La afinidad de un sitio de unión X por un ligando Y se representa mediante la constante de disociación (K_d), que es la concentración de Y que se requiere para ocupar la mitad de los sitios de unión de X presentes en una solución. Una (K_d) más baja indica una interacción más fuerte o de mayor afinidad entre X e Y, y se necesita una concentración más baja de ligando para ocupar los sitios. En general, la afinidad de unión puede verse afectada por la alteración, modificación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en el epítipo reconocido por el paratopo (porción de la molécula que reconoce el epítipo). La afinidad de unión también puede verse afectada por la alteración, modificación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en el paratopo. La

afinidad de unión puede ser la afinidad del anticuerpo que se une a un antígeno.

En un ejemplo, la afinidad de unión puede medirse mediante titulación de punto final en un ensayo Ag-ELISA. La afinidad de unión puede reducirse sustancialmente (o reducirse de manera considerable) mediante la modificación y/o sustitución de uno o más aminoácidos en el epítipo reconocido por el paratopo de anticuerpos si el título de punto final de un anticuerpo específico para el epítipo modificado/sustituido difiere en al menos 4 veces, tal como al menos 10 veces, al menos 100 veces o más, en comparación con el epítipo inalterado.

Molécula de dominio CH2 o CH3: Un polipéptido (o ácido nucleico que codifica un polipéptido) derivado de un dominio CH2 o CH3 de inmunoglobulina. A menos que se indique lo contrario, la inmunoglobulina puede ser IgG, IgA, IgD, IgE o IgM. La molécula CH2 o CH3 está compuesta por una serie de cadenas β paralelas conectadas por bucles de secuencia de aminoácidos no estructurada. La molécula de dominio CH2 o CH3 puede comprender adicionalmente una secuencia o secuencias de aminoácidos adicionales, tales como un bucle hipervariable completo. En algunas realizaciones, los dominios CH2 o CH3 comprenden una o más mutaciones en una región de bucle de la molécula. En algunas realizaciones, los dominios CH2 o CH3 comprenden una o más mutaciones en una región de armazón (por ejemplo, para la estabilización, etc.). Una "región de bucle" de un dominio CH2 o CH3 se refiere a la porción de la proteína ubicada entre las regiones de la lámina β (por ejemplo, cada dominio CH2 comprende siete láminas β , de A a G, orientadas del extremo N al C). Un dominio CH2 comprende seis regiones de bucle: Bucle 1, Bucle 2, Bucle 3, Bucle A-B, Bucle C-D y Bucle E-F. Los bucles A-B, C-D y E-F se ubican entre las láminas β A y B, C y D, y E y F, respectivamente. Los bucles 1, 2 y 3 se ubican entre las láminas β B y C, D y E, y F y G, respectivamente. Estos bucles en el dominio CH2 natural con frecuencia se denominan bucles estructurales. Pueden encontrarse ejemplos no limitantes de moléculas del dominio CH2 en el documento WO 2009/099961.

Las moléculas de dominio CH2 y CH3 de origen natural son de tamaño pequeño, generalmente inferior a 15 kD. Las moléculas de dominio CH2 y CH3 modificadas por ingeniería genética pueden variar en tamaño dependiendo de la longitud de los bucles donadores insertados en las regiones de bucle, de cuántos bucles donadores se insertan y de si hay otra molécula (tal como un resto de unión, una molécula efectora o un marcador) conjugada o unida al dominio CH2 o CH3. El dominio CH2 puede ser de IgG, IgA o IgD. El dominio CH2 puede ser de un dominio CH3 de IgE o IgM, que es homólogo a los dominios CH2 de IgG, IgA o IgD.

CH2D: Una molécula de dominio CH2 o CH3. La molécula de dominio CH2 o CH3 puede modificarse por ingeniería genética de manera que la molécula se una específicamente a un antígeno. Las moléculas de dominio CH2 y CH3 modificadas por ingeniería genética para unirse al antígeno se encuentran entre las moléculas más pequeñas conocidas a base de dominio de anticuerpo de unión a antígeno específico que pueden conservar la unión al receptor Fc.

Puesta en contacto: Colocación en asociación física directa, que incluye tanto en forma sólida como líquida.

Polinucleótido degenerado: Como se usa en el presente documento, un "polinucleótido degenerado" es un polinucleótido que codifica una proteína (por ejemplo, una molécula de sarcina modificada, una proteína de fusión) que incluye una secuencia que se degenera como resultado de redundancias en el código genético. Existen 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales se especifican mediante más de un codón. Por tanto, se incluyen todas las secuencias de nucleótidos degenerados siempre que la secuencia de aminoácidos de la proteína (por ejemplo, la molécula de sarcina modificada, proteína de fusión) codificada por la secuencia de nucleótidos no cambie.

Preferentemente, los codones se expresan bien en el organismo hospedador seleccionado. El uso de las versiones degeneradas de los ácidos nucleicos codificantes puede optimizar la expresión ("optimización de codones") en diferentes sistemas de expresión. Por ejemplo, los sistemas de expresión de *E. coli* pueden preferir un codón para un aminoácido, mientras que un sistema de expresión de proteína de *Pichia* puede preferir un codón diferente para el mismo aminoácido en esa posición de la proteína.

Dominio: Una estructura de proteína que conserva su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. En algunos casos, los dominios tienen propiedades funcionales discretas y pueden añadirse, retirarse o transferirse a otra proteína sin pérdida de función.

Molécula efectora: Una molécula, o la porción de una molécula quimérica, que se pretende que tenga un efecto deseado en una célula a la que se dirige la molécula o molécula quimérica. Una molécula efectora también se conoce como un resto efector (RE), agente terapéutico o agente de diagnóstico, o términos similares. Los ejemplos de moléculas efectoras incluyen, pero sin limitación, un marcador detectable, proteína biológicamente activa, fármaco, molécula citotóxica o toxina (molécula citotóxica).

Epítipo: Un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias peptídicas contiguas o no contiguas en una molécula que son antigénicos, es decir, que desencadenan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se une a un epítipo antigénico particular basándose en la estructura tridimensional del anticuerpo y el epítipo apareado (o afín).

Expresión: La traducción de una secuencia de ácido nucleico en una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o secretarse en la matriz o medio extracelular.

5 **Secuencias de control de expresión:** Secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga a la que están unidas operativamente. Las secuencias de control de expresión están unidas operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por tanto, las
10 secuencias de control de expresión pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (por ejemplo, ATG) frente a un gen que codifica proteínas, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada de ARNm y codones de parada apropiados. La expresión "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, componentes cuya presencia pueda influir en la expresión y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea
15 ventajosa, por ejemplo, secuencias líderes y secuencias asociadas a la fusión. Las secuencias de control de expresión pueden incluir un promotor.

Un promotor es una serie de secuencias de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como,
20 en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden ubicarse hasta a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo, Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology* 153:516-544).

25 También se incluyen los elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente del promotor sea controlable para la específica de tipo celular, la específica de tejido, o inducible mediante señales o agentes externos; dichos elementos pueden estar ubicados en las regiones 5' o 3' del gen. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo, Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology* 153:516-544).
30 Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL del bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares. En algunas realizaciones, cuando se clona en sistemas de células de mamíferos, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamíferos (tales como el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (tales como la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5 K del virus variolovacunal, etc.). También pueden usarse promotores producidos mediante ADN recombinante o técnicas de síntesis para proporcionar la
35 transcripción de las secuencias de ácido nucleico.

Puede insertarse un polinucleótido en un vector de expresión que contenga una secuencia promotora que facilite la transcripción eficiente de la secuencia genética insertada del hospedador. El vector de expresión normalmente contiene un origen de replicación, un promotor, así como secuencias de ácido nucleico específicas que permiten la
40 selección fenotípica de las células transformadas.

Sistema de expresión: Un sistema para expresar un producto génico, por ejemplo, una proteína. Los sistemas de expresión pueden basarse en células o ser sin células. Los ejemplos de sistemas de expresión incluyen, pero sin limitación, sistemas bacterianos (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*), sistemas de levadura (por ejemplo, *Pichia*, *S. cerevisiae*), un sistema de insecto, un sistema eucariota, sistemas víricos (por ejemplo, baculo-virus, lambda, retrovirus) y similares.

Regiones de unión a Fc: Se sabe que la región de unión a FcRn de la región CH2 comprende los restos de aminoácidos M252, I253, S254, T256, V259, V308, H310, Q311 (numeración Kabat de IgG). Estos restos de aminoácidos se han identificado a partir de estudios de la molécula completa de IgG y/o el fragmento Fc para ubicar los restos del dominio CH2 que afectan directamente a la interacción con FcRn. Tres líneas de investigación han sido particularmente esclarecedoras: (a) estudios cristalográficos de los complejos de FcRn unidos a Fc, (b) comparaciones de los diversos isotipos humanos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) entre sí y con IgG de otras especies que presentan diferencias en la unión a FcRn y la semivida sérica, correlacionando la variación en las propiedades con diferencias específicas de restos de aminoácidos y (c) análisis de mutaciones, en particular el aislamiento de mutaciones que muestran una unión potenciada a FcRn, pero conservan la dependencia del pH de la interacción con FcRn. Los tres enfoques destacan las mismas regiones de la región CH2 como cruciales para la interacción con FcRn. El dominio CH3 de IgG también contribuye a la interacción con FcRn, pero se cree que la protonación/desprotonación de H310 es la principal responsable de, y suficiente para, la dependencia del pH de la interacción. En la presente invención, una proteína de fusión de ribotoxina puede comprender opcionalmente un dominio CH2 con un sitio de unión a FcRn funcional (o sitios de unión adicionales) para una semivida potenciada de la molécula de proteína de fusión.

Heterólogo: Un polipéptido o polinucleótido heterólogo se refiere a un polipéptido o polinucleótido derivado de una fuente o especie diferente.

Respuesta inmunitaria: Una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, linfocito T, macrófago o un polimorfonucleocito, a un estímulo tal como un antígeno. Una respuesta inmunitaria puede incluir cualquier célula del cuerpo implicada en una respuesta de defensa del hospedador, por ejemplo, una célula epitelial que secreta un interferón o una citocina. Una respuesta inmunitaria incluye, pero sin limitación, una respuesta inmunitaria innata o inflamación.

Inmunoconjugado: Un enlace covalente de una molécula efectora con una molécula de direccionamiento. La molécula efectora puede ser un marcador detectable, proteína biológicamente activa, fármaco, molécula citotóxica o toxina (molécula citotóxica).

Los ejemplos específicos, no limitantes, de toxinas incluyen, pero sin limitación, abrina, ricina, exotoxina de *Pseudomonas* (PE, por sus siglas en inglés, tal como PE35, PE37, PE38 y PE40), toxina diftérica (DT, por sus siglas en inglés), toxina botulínica, toxinas de molécula pequeña, saporina, restrictocina o gelonina, sarcina, ricina, fragmentos de las mismas o toxinas modificadas de las mismas. Otros agentes citotóxicos pueden incluir auristatina, maytansinoides y péptidos citolíticos. Otros inmunoconjugados pueden estar compuestos por una proteína de unión (por ejemplo, una molécula de direccionamiento con un resto de unión) unida a moléculas de fármacos (CFA o "conjugados anticuerpo-fármaco"; Ducry y Stump, *Bioconj Chem* 21: 5-13, 2010; Erikson et al., *Bioconj Chem* 21: 84-92, 2010). Estas toxinas/inmunotoxinas pueden inhibir directa o indirectamente el crecimiento celular o destruir células. Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que normalmente provocan la muerte por toxicidad hepática. PE y DT, sin embargo, pueden modificarse en una forma para su uso como inmunotoxina retirando el componente de direccionamiento nativo de la toxina (tal como el dominio la de PE o la cadena B de DT) y reemplazándolo con una fracción de direccionamiento diferente. En algunas realizaciones, una molécula de sarcina modificada o una proteína de fusión de la presente invención se une a una molécula efectora (ME). Los conjugados de anticuerpo-fármaco (CFA), que son fármacos (por ejemplo, agentes citotóxicos) conjugados con anticuerpos (o fragmentos de los mismos), entregan moléculas terapéuticas a sus compañeros de unión al conjugado. La molécula efectora puede ser un fármaco de molécula pequeña o una proteína biológicamente activa, tal como la eritropoyetina. En algunas realizaciones, la molécula efectora puede ser un dominio de inmunoglobulina, tal como un dominio VH o CH1. En algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada o la proteína de fusión unida a una molécula efectora se une adicionalmente a un lípido u otra molécula a una proteína o péptido para aumentar su semivida. El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. "Medios químicos" se refiere a una reacción entre la molécula de sarcina modificada o la proteína de fusión y la molécula efectora de manera que se forma un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula. Puede incluirse opcionalmente un enlazador peptídico (secuencia peptídica corta) entre la molécula de sarcina modificada o la proteína de fusión y la molécula efectora. Un enlazador de este tipo puede someterse a proteólisis mediante un enlazador endógeno o exógeno para liberar la molécula efectora en un sitio de acción deseado. Debido a que los inmunoconjugados se prepararon originariamente a partir de dos moléculas con funcionalidades separadas, tales como un anticuerpo y una molécula efectora, en ocasiones también se denominan "moléculas quiméricas". La expresión "molécula quimérica", como se usa en el presente documento, por tanto, se refiere a un resto de direccionamiento, tal como un ligando, anticuerpo o fragmento o dominio del mismo, conjugado (acoplado) con una molécula efectora.

Los términos "conjugación", "unión", "enlace" o "conexión" se refieren a convertir dos polipéptidos en una molécula polipeptídica contigua, o a unir covalentemente un radionucleótido u otra molécula a un polipéptido. En el contexto específico, los términos pueden referirse, en algunas realizaciones, a unir un ligando, tal como un resto de anticuerpo, a una molécula efectora ("ME"). Los términos "conjugación", "unión", "enlace" o "conexión" también pueden referirse a la unión de un péptido a una toxina (por ejemplo, sarcina, molécula de sarcina modificada, etc.).

Inmunógeno: Un compuesto, composición o sustancia que, en condiciones apropiadas, es capaz de estimular una respuesta inmunitaria, tal como la producción de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo las composiciones que se inyectan o se absorben en un animal.

El término "inmunogenia" como se usa en el presente documento es la capacidad de un inmunógeno para desencadenar una respuesta inmunitaria. La respuesta inmunitaria puede ser tanto una respuesta humoral como celular. Preferentemente, la respuesta inmunitaria es una respuesta de linfocitos T. La medición de la activación de una respuesta inmunitaria puede realizarse mediante varios métodos bien conocidos en la técnica.

La expresión "inmunogenia reducida" como se usa en el presente documento significa que la ribotoxina modificada o la proteína de fusión de ribotoxina modificada es menos inmunógena que la correspondiente ribotoxina no modificada o proteína de fusión de ribotoxina no modificada. Preferentemente, la ribotoxina modificada o la proteína de fusión de ribotoxina modificada desencadena una respuesta de linfocitos T reducida en comparación con la correspondiente ribotoxina no modificada o proteína de fusión de ribotoxina no modificada.

La expresión "respuesta de linfocitos T reducida" como se usa en el presente documento significa que la ribotoxina modificada o la proteína de fusión de ribotoxina modificada induce menos activación de linfocitos T que la correspondiente ribotoxina no modificada o proteína de fusión de ribotoxina no modificada, medida mediante un ensayo de proliferación de linfocitos T *in vitro* (incorporación de ³[H]-timidina) usando células mononucleares de sangre periférica humana empobrecidas en CD8+. En una realización, el índice de estimulación (IE) de la ribotoxina

modificada o la proteína de fusión de ribotoxina modificada es inferior a 2,0 y más preferentemente inferior a 1,5. La expresión "índice de estimulación", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de la ribotoxina modificada o la proteína de fusión de ribotoxina modificada para activar linfocitos T. El IE se presenta convencionalmente como los rpm medios por muestra de ensayo/rpm medios por muestra de control (sin ningún péptido de ensayo).

Aislado: Un componente biológico "aislado" (tal como una molécula de ácido nucleico o proteína) que se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos de los que el componente produce de forma natural (por ejemplo, otros componentes biológicos de una célula), tal como otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos y proteínas, incluyendo otros anticuerpos. Los ácidos nucleicos y las proteínas que se han "aislado" incluyen los ácidos nucleicos y las proteínas purificados mediante métodos de purificación convencionales. Un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que se ha separado o purificado sustancialmente de otras proteínas o componentes biológicos de manera que se mantenga su especificidad antigénica. La expresión también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos o proteínas sintetizados químicamente o fragmentos de los mismos.

Marcador: Un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con otra molécula (por ejemplo, una molécula de sarcina modificada, una molécula de direccionamiento, una proteína de fusión de ribotoxina, etc.) para facilitar la detección de esa molécula. Los ejemplos específicos, no limitantes, de marcadores incluyen marcadores fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos. ¿SARCINA A RIBOTOXINA?

Resto de contacto con ligando o resto de determinación de especificidad (SDR): Un resto de aminoácido dentro de una molécula que participa en la puesta en contacto de un ligando o antígeno. Un resto de contacto con ligando también se conoce como resto determinante de especificidad (SDR, por sus siglas en inglés).

Enlazadores: enlaces covalentes o no covalentes muy estrechos; conjugación química o fusiones génicas directas de diversas secuencias de aminoácidos, especialmente aquellas ricas en Glicina, Serina, Prolina, Alanina o variantes de secuencias de aminoácidos de unión de origen natural que conectan dominios de inmunoglobulina y/o hidratos de carbono que incluyen, pero sin limitación, polietilenglicoles (PEG), por ejemplo, PEG individuales (dPEG). Las longitudes típicas pueden variar de 2 hasta 20 o más aminoácidos, sin embargo, la presente invención no se limita a estas longitudes (por ejemplo, el enlazador puede ser un péptido entre 1 y 20 aminoácidos). Las longitudes óptimas pueden variar para emparejar el espaciado y la orientación del antígeno o los antígenos diana específicos, minimizando la entropía pero permitiendo la unión eficaz de múltiples antígenos.

Modificación: cambios en una secuencia proteínica, estructura proteínica, etc., o cambios en una secuencia de ácido nucleico, etc. Como se usa en el presente documento, el término "modificado" o "modificación" puede incluir una o más mutaciones, supresiones, sustituciones, alteración física (por ejemplo, modificación de reticulación, unión covalente de un componente, modificación postraducciona, por ejemplo, acetilación, glucosilación, similares o una combinación de los mismos), similares o una combinación de los mismos. La modificación, por ejemplo, la mutación, no se limita a la modificación aleatoria (por ejemplo, mutagénesis aleatoria) sino que también incluye el diseño racional.

Dominio multimerizante. Se conocen muchos dominios dentro de las proteínas que forman un dímero o multímero no covalente muy estrecho mediante la asociación con otro dominio o dominios de proteínas. Algunos de los ejemplos más pequeños son los denominados motivos de cremallera de leucina, que son dominios compactos que comprenden repeticiones heptad que pueden autoasociarse para formar un homodímero (por ejemplo, GCN4); como alternativa, pueden asociarse preferentemente con otra cremallera de leucina para formar un heterodímero (por ejemplo, dímeros myc/max) o tetrámeros más complejos (*Chem Biol.* 22 de septiembre de 2008; 15 (9): 908-19. *A heterospecific leucine zipper tetramer.* Deng Y, Liu J, Zheng Q, Li Q, Kallenbach NR, Lu M.). Los dominios estrechamente relacionados que tienen isoleucina en lugar de leucina en las repeticiones en héptada forman ensamblajes de "superenrollamiento" triméricos (por ejemplo, gp41 de VIH). La sustitución de isoleucina por leucina en las repeticiones en héptada de un dímero puede alterar la estructura favorecida a un trímero. Los dominios pequeños tienen ventajas para la fabricación y para mantener un tamaño pequeño para la molécula de proteína completa, pero los dominios más grandes pueden ser útiles para la formación de multímeros. Se podría emplear cualquier dominio que forme multímeros no covalentes. Por ejemplo, los dominios CH3 de IgG forman homodímeros, mientras que los dominios CH1 y CL de IgG forman heterodímeros.

Ácido nucleico: Un polímero compuesto de unidades de nucleótidos (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, variantes estructurales de origen natural relacionadas y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos) unidos mediante enlaces fosfodiéster, variantes estructurales de origen natural relacionadas y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos. Por tanto, la expresión incluye polímeros de nucleótidos en los que los nucleótidos y los enlaces entre ellos incluyen análogos sintéticos de origen no natural, tales como, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2'-O-ribonucleótidos de metilo, ácidos nucleicos peptídicos (ANP) y similares. Dichos polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado. El término "oligonucleótido" se refiere normalmente a polinucleótidos cortos, generalmente no superiores a aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de

nucleótidos se representa mediante una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN complementaria (es decir, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza "T".

En el presente documento se usa la notación convencional para describir secuencias de nucleótidos:

5 extremo izquierdo de una secuencia de nucleótidos monocatenaria es el extremo 5'; la dirección izquierda de una secuencia de nucleótidos bicatenaria se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de nucleótidos a transcripciones de ARN naciendo se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que un ARNm transcrito a partir de ese ADN y que se ubican en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias corriente arriba"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' de la transcripción del ARN codificante se denominan "secuencias corriente abajo".

15 **ADNc** se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, en forma monocatenaria o bicatenaria. "Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm producido por ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y por lo general se proporciona en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción, de un gen o ADNc pueden denominarse como la codificación de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

30 **Ácido nucleico recombinante** se refiere a un ácido nucleico que tiene secuencias de nucleótidos que no se unen entre sí de forma natural y pueden prepararse combinando artificialmente dos segmentos de secuencia separados de otra manera. Esta combinación artificial con frecuencia se logra mediante síntesis química o, más habitualmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Los ácidos nucleicos recombinantes incluyen vectores de ácido nucleico que comprenden un ácido nucleico amplificado o ensamblado, que pueden usarse para transformar o transfectar una célula hospedadora adecuada. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico recombinante se denomina "célula hospedadora recombinante". Después, el gen se expresa en la célula hospedadora recombinante para producir un "polipéptido recombinante". Un ácido nucleico recombinante también puede cumplir una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión al ribosoma y similares).

40 **Unido operativamente:** Una primera secuencia de un ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de un ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

45 **Vehículos farmacéuticamente aceptables:** Los excipientes (vehículos) farmacéuticamente aceptables útiles en la presente divulgación pueden ser convencionales pero no se limitan a vehículos convencionales. Por ejemplo, E. W. Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975) y D. B. Troy, ed. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Philadelphia, PA, 21ª Edición (2006) describen composiciones y formulaciones adecuadas para la entrega farmacéutica de uno o más moléculas o compuestos terapéuticos, tales como uno o más anticuerpos y agentes farmacéuticos adicionales.

55 En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales por lo general comprenden líquidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Como ejemplo no limitante, la formulación para trastuzumab inyectable incluye HCl de L-histidina, L-histidina, dihidrato de trehalosa y polisorbato 20 en forma de un polvo seco en un vial de vidrio que se reconstituye con agua estéril antes de la inyección. Se conocen bien en la técnica otras formulaciones de anticuerpos y proteínas para su uso parenteral o subcutáneo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos atóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que han de administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares atóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.

65 **Polipéptido:** Un polímero en el que los monómeros son restos de aminoácidos que se unen entre sí a través de

enlaces amida. Cuando los aminoácidos son α -aminoácidos, puede usarse el isómero L-óptico o el isómero D-óptico. Los términos "polipéptido" o "proteína" como se usan en el presente documento tienen por objeto abarcar cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glucoproteínas. El término "polipéptido" puede abarcar proteínas de origen natural, dependiendo del contexto, así como aquellas que se producen de forma recombinante o sintética. La expresión "resto" o "resto de aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido.

Las sustituciones de aminoácidos "**conservadoras**" son aquellas sustituciones que no afectan sustancialmente ni disminuyen una actividad o antigenicidad de un polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido puede incluir como máximo aproximadamente 1, como máximo aproximadamente 2, como máximo aproximadamente 5, como máximo aproximadamente 10 o como máximo aproximadamente 15 sustituciones conservadoras y puede unir específicamente un anticuerpo que se une al polipéptido original. La expresión variación conservadora también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental sin sustituir, a condición de que los anticuerpos generados contra el polipéptido sustituido también inmunoreaccionen con el polipéptido sin sustituir. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen: (i) Ala - Ser; (ii) Arg - Lys; (iii) Asn - Gin o His; (iv) Asp - Glu; (v) Cys - Ser; (vi) Gin - Asn; (vii) Glu - Asp; (viii) His - Asn o Gin; (ix) Ile - Leu o Val; (x) Leu - Ile o Val; (xi) Lys - Arg, Gln o Glu; (xii) Met - Leu o Ile; (xiii) Phe - Met, Leu o Tyr; (xiv) Ser - Thr; (xv) Thr - Ser; (xvi) Trp - Tyr; (xvii) Tyr - Trp o Phe; (xviii) Val - Ile o Leu.

Las sustituciones conservadoras mantienen generalmente (a) la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o la hidrofobia de la molécula en el sitio diana y/o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que en general se espera que produzcan los mayores cambios en las propiedades proteínicas serán no conservadoras, por ejemplo, cambios en los que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serina o treonina, se sustituye por (o mediante) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina o alanina; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o mediante) cualquier otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina o histidina, se sustituye por (o mediante) un resto electronegativo, por ejemplo, glutamato o aspartato; o (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o mediante) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina.

Prevención, tratamiento, gestión o mejora de una enfermedad: "Prevención" de una enfermedad se refiere a inhibir el desarrollo completo de una enfermedad. "Tratamiento" se refiere a una intervención terapéutica que mejora un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica después de haber comenzado a desarrollarse. "Gestión" se refiere a una intervención terapéutica que no permite que los signos o síntomas de una enfermedad empeoren. "Mejora" se refiere a la reducción en el número o la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad.

Sondas y cebadores: Una sonda comprende un ácido nucleico aislado unido a un marcador o molécula indicadora detectable. Los cebadores son ácidos nucleicos cortos y pueden ser oligonucleótidos de ADN de 15 nucleótidos o más de longitud, por ejemplo. Los cebadores pueden hibridarse con una cadena de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, y después pueden extenderse a lo largo de la cadena de ADN diana mediante una enzima ADN polimerasa. Pueden usarse pares de cebadores para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica. Un experto en la materia apreciará que la especificidad de una sonda o cebador particular aumenta con su longitud. Por tanto, por ejemplo, un cebador que comprende 20 nucleótidos consecutivos se hibridará con una diana con una especificidad mayor que un cebador correspondiente de solo 15 nucleótidos. Por tanto, con el fin de obtener una especificidad mayor, pueden seleccionarse sondas y cebadores que comprendan 20, 25, 30, 35, 40, 50 o más nucleótidos consecutivos.

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; si no que se concibe como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una molécula purificada es una que se aísla en su totalidad o en parte a partir de proteínas y otros contaminantes asociados de forma natural en los que la molécula se purifica en un grado medible con respecto a su estado natural, por ejemplo, con respecto a su pureza dentro de un extracto celular o fluido biológico.

El término "purificado" incluye productos deseados tales como análogos o miméticos u otros compuestos biológicamente activos en donde se unen compuestos o restos adicionales a la molécula con el fin de permitir la unión de otros compuestos y/o proporcionar formulaciones útiles en procedimientos terapéuticos de tratamiento o diagnóstico.

En general, las moléculas sustancialmente purificadas incluyen más del 80 % de todas las especies macromoleculares presentes en una preparación antes de la mezcla o la formulación del compuesto respectivo con ingredientes adicionales en una formulación farmacéutica completa para la administración terapéutica. Los ingredientes adicionales pueden incluir un vehículo farmacéutico, excipiente, tampón, agente potenciador de la absorción, estabilizante, conservante, adyuvante u otros co-ingredientes similares. Más normalmente, la molécula se purifica para representar más del 90 %, con frecuencia más del 95 % de todas las especies macromoleculares

presentes en una preparación purificada antes de mezclarla con otros ingredientes de formulación. En otros casos, la preparación purificada puede ser esencialmente homogénea, en donde otras especies macromoleculares representan menos del 1 %.

5 **Proteína recombinante:** Para un ácido nucleico recombinante, véase "Ácido nucleico recombinante" anteriormente. Una proteína o polipéptido recombinante es uno que tiene una secuencia que no es de origen natural o tiene una secuencia que se prepara mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia separados de otra manera. Esta combinación artificial con frecuencia se logra mediante síntesis química o, más habitualmente, mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Las proteínas recombinantes pueden prepararse en células transducidas, transfectadas o transformadas con elementos genéticos para dirigir la síntesis de la proteína heteróloga. También pueden prepararse en sistemas sin células. Las células hospedadoras que son particularmente útiles incluyen células de mamíferos tales como CHO y HEK 293, células de insecto, levaduras tales como *Pichia pastoris* o *Saccharomyces* o células bacterianas tales como *E. coli* o *Pseudomonas*.

15 **Muestra:** Una porción, trozo o segmento que es representativo de un todo. Este término abarca cualquier material, incluyendo, por ejemplo, muestras obtenidas de un sujeto.

20 Una "muestra biológica" es una muestra obtenida de un sujeto que incluye, pero sin limitación, células, tejidos y fluidos corporales. Los fluidos corporales incluyen, por ejemplo, saliva, esputo, fluido espinal, orina, sangre y derivados y fracciones de sangre, incluyendo suero y linfocitos (tales como linfocitos B, linfocitos T y subfracciones de los mismos). Los tejidos incluyen aquellos de biopsias, autopsias y muestras de anatomía patológica, así como también tejidos biopsiados o extirpados quirúrgicamente, incluyendo tejidos que están, por ejemplo, sin fijar, congelados, fijados en formol y/o incrustados en parafina.

25 En algunas realizaciones, se obtiene una muestra biológica de un sujeto, tal como sangre o suero. Una muestra biológica se obtiene normalmente de un mamífero, tal como una rata, ratón, vaca, perro, cobaya, conejo o primate. En algunas realizaciones, el primate es un macaco, un chimpancé o un ser humano.

30 **Armazón:** Una molécula de plataforma utilizada con frecuencia para la introducción de otros dominios, bucles, mutaciones y similares. Como ejemplo, un armazón de dominio CH2 o CH3 es un dominio CH2 o CH3 que puede usarse para introducir bucles donadores y/o mutaciones (tal como en las regiones de bucle) con el fin de conferir la unión de antígeno al dominio CH2 o CH3. En algunas realizaciones, un armazón se altera para presentar una mayor estabilidad en comparación con la molécula nativa. Por ejemplo, un armazón puede mutarse para introducir pares de restos de cisteína para permitir la formación de uno o más enlaces disulfuro no nativos. Los armazones no se limitan a estas definiciones. En otro ejemplo, un armazón puede ser el dominio de fibronectina de tipo III, Centryn, Affibody, DARPIN, péptidos cíclicos, nanoanticuerpos (dominios VHH de llamas), dominios de tiburón, etc.

40 **Identidad de secuencia:** La similitud entre las secuencias de nucleótidos o aminoácidos se expresa en términos de la similitud entre las secuencias, también conocida como identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide con frecuencia en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencia global o en determinadas regiones cuando se alinean usando métodos convencionales.

45 Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para la comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman y Wunsch, *Journal of Molecular Biol.* 48: 443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene* 73: 237-244, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-153, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16: 10881-10890, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444, 1988. Altschul et al., *Nature Genetics* 6: 119-129, 1994.

50 La herramienta de búsqueda de alineación local básica de NCBI (BLAST™) (Altschul et al., *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información Biotecnológica de los EE.UU. (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para su uso en conexión con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, blastn y tblastx.

60 **Agente de unión específico:** Un agente que se une sustancialmente solamente a una diana definida. Por tanto, un agente de unión específico de antígeno es un agente que se une sustancialmente a un polipéptido antigénico o fragmento antigénico del mismo. En una realización, el agente de unión específico es un anticuerpo monoclonal o policlonal o un péptido o una molécula de armazón que se une específicamente al polipéptido antigénico o fragmento antigénico del mismo.

65 La expresión "se une específicamente" se refiere a la asociación preferente de un agente de unión o resto de direccionamiento (tal como hormonas, péptidos, fragmentos de péptidos, dominios, citocinas, otros ligandos y receptores, armazones, etc.), en su totalidad o en parte, con la diana (por ejemplo, una célula o tejido que lleva esa diana de ese agente de unión) y no a no dianas (por ejemplo, células o tejidos que carecen de una cantidad

detectable de esa diana). Por supuesto, se reconoce que puede producirse un determinado grado de interacción no específica entre una molécula y una célula o tejido no diana. No obstante, la unión específica puede distinguirse como mediada a través del reconocimiento específico del antígeno. Una diversidad de formatos de inmunoensayo es apropiada para seleccionar moléculas específicamente reactivas con una proteína particular. Por ejemplo, se usan inmunoensayos ELISA en fase sólida de forma rutinaria.

Sujeto: Organismos multicelulares vivos, incluyendo organismos vertebrados, una categoría que incluye mamíferos tanto humanos como no humanos.

Los **agentes terapéuticos** incluyen compuestos tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glucoproteínas, radioisótopos, lípidos, hidratos de carbono, moléculas pequeñas, virus recombinantes o similares. Los restos de ácido nucleico terapéuticos y de diagnóstico incluyen ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivatizados para la reticulación covalente con ADN simple o dúplex y oligonucleótidos formadores de tríplex. Como alternativa, la molécula unida a un resto de direccionamiento puede ser un sistema de encapsulación, tal como un liposoma o una micela que contiene una composición terapéutica tal como un fármaco, un ácido nucleico (tal como un ácido nucleico antisentido) u otro resto terapéutico que puede protegerse de la exposición directa al sistema circulatorio. Los expertos en la materia conocen bien medios de preparación de liposomas unidos a anticuerpos. Véanse, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 4.957.735; y Connor et al. 1985, *Pharm. Ther.* 28: 341-365. Los agentes o restos de diagnóstico incluyen radioisótopos y otros marcadores detectables. También se conocen en la técnica marcadores detectables útiles para dichos propósitos e incluyen isótopos radiactivos tales como Tc^{99m}, In¹¹¹, ³²P, ¹²⁵I y ¹³¹I, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes y enzimas.

Cantidad terapéuticamente eficaz: Una cantidad de un agente especificado suficiente para conseguir un efecto deseado en un sujeto que se está tratando con ese agente. Dichos agentes incluyen las moléculas de ribotoxina modificadas (por ejemplo, molécula de sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina modificada) y las proteínas de fusión que se describen en el presente documento. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad de una proteína de fusión que comprende una molécula de sarcina modificada útil para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad o afección, tal como cáncer. Idealmente, una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de ribotoxina modificada (por ejemplo, molécula de sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina modificada) o proteína de fusión es una cantidad suficiente para prevenir, tratar o mejorar la afección o enfermedad, en un sujeto sin provocar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto. La cantidad terapéuticamente eficaz de un agente útil para prevenir, mejorar y/o tratar un sujeto dependerá del sujeto que se trata, del tipo y la gravedad de la afección y de la forma de administración de la composición terapéutica.

Toxina: Véase *Inmunoconjugado*

Transducido: Una célula transducida es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Como se usa en el presente documento, el término transducción abarca todas las técnicas mediante las cuales puede introducirse una molécula de ácido nucleico en una célula de este tipo, incluyendo la transfección con vectores víricos, la transformación con vectores plasmídicos y la introducción de ADN desnudo mediante electroporación, lipofección y aceleración con cañón de partículas. Dichas células a veces se denominan células transformadas.

Vector: Una molécula de ácido nucleico que se introduce en una célula hospedadora, produciendo de este modo una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

Descripción detallada

La presente divulgación proporciona moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina) modificadas, en donde las moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina) modificadas son menos o nada inmunógenas en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) de tipo silvestre. La molécula de ribotoxina de tipo silvestre (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina de tipo silvestre) se modifica para crear la "molécula de ribotoxina modificada", donde la modificación de la molécula de ribotoxina de tipo silvestre reduce su inmunogenia, por ejemplo, reduce o elimina el número de epítopos de linfocitos T (como se describe a continuación). Como se usa en el presente documento, el término "modificada" puede incluir una o más mutaciones, supresiones, adiciones, sustituciones, truncamientos, alteración física (por ejemplo, modificación de reticulación, unión covalente de un componente, modificación postraduccional, por ejemplo, acetilación, glucosilación) y similares.

EPÍTOPOS DE LINFOCITOS T

Cuando una célula presentadora de antígeno del sistema inmunitario capta una proteína, la proteína se digiere ("procesa") proteolíticamente en péptidos, algunos de los cuales pueden unirse a moléculas del CMH de clase II y

presentarse en la superficie de células presentadoras de antígenos a los linfocitos T. Se cree que la unión de péptidos al CMH de clase II se debe a interacciones entre las cadenas laterales de aminoácidos de los péptidos y los "bolsillos" de unión específicos dentro del surco del CMH, por ejemplo, posiciones de bolsillo p1, p4, p6, p7 y p9 dentro de los surcos de unión de extremos abiertos de 34 alelos del CMH de clase II humano. Los aminoácidos del péptido que interactúan con las posiciones de bolsillo p1, p4, p6, p7 y p9 de la molécula del CMH de clase II se denominan restos de anclaje (por ejemplo, P1, P4, P6, P7 y P9).

En situaciones donde dichos péptidos presentados activan linfocitos T CD4+ (auxiliares), estos péptidos se definen como epítomos de linfocitos T CD4+, que se originan donde el complejo de péptido y CMH de clase II se une mediante un receptor de linfocitos T y, junto con señales coestimuladoras, dan como resultado la activación de linfocitos T. En dichos casos, estos péptidos se unen dentro de un surco dentro de la molécula de CMH de clase II y las variaciones alotípicas en el CMH de clase II pueden influir en la unión de dichos péptidos y, en algunos casos, pueden restringir la unión a un pequeño número de alotipos ("restricción de alotipo"). En otros casos, los péptidos pueden unirse ampliamente a diferentes alotipos de CMH, dicha unión no restringida se denomina unión "promiscua" o "degenerada".

MOLECULAS DE SARCINA MODIFICADAS

La Tabla 1 muestra la secuencia correspondiente a la α -sarcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1). Las moléculas de sarcina modificadas de la presente invención derivan de una α -sarcina "parental", por ejemplo, α -sarcina de tipo silvestre o fragmentos de α -sarcina de tipo silvestre.

TABLA 1

SEQ ID NO	α -SARCINA DE TIPO SILVESTRE
1	AVTWTCLNDQ KNPKTNKYET KRLLYNQNKAE SSSHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPKENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTKE NQGELKLC SH

En el presente documento se describe un análisis por ordenador de la proteína α -sarcina de tipo silvestre para identificar posibles epítomos de linfocitos T. Brevemente, todos los péptidos noaméricos solapados de la secuencia de α -sarcina de tipo silvestre se enhebraron a través de una base de datos de 34 alotipos DR del CMH de clase II humano y se puntuaron individualmente basándose en su ajuste e interacciones con cada una de las moléculas del CMH de clase II.

Los resultados de este trabajo sugieren que la α -sarcina de tipo silvestre contiene al menos tres epítomos de linfocitos T posibles que comprenden un único péptido de unión al CMH de afinidad alta promiscuo con anclaje p1 en el resto 24 (L/leucina) y dos péptidos de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con anclajes p1 en los restos 122 (V/valina) y 134 (I/isoleucina) (véase la Tabla 2).

También se identificaron otros epítomos posibles de linfocitos T poco o muy poco inmunógenos.

TABLA 2

SEQ ID NO	EPÍTOMOS DE LINFOCITOS T POSIBLES
2	Péptido de unión al CMH de afinidad alta promiscuo con anclaje p1 LYNQNKAE S
3	Péptido de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con anclaje p1 VIYTYPNKV
4	Péptido de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con anclaje p1 IIAHTKENQ

La α -sarcina de tipo silvestre se analizó adicionalmente mediante el ensayo de inmunogenia EpiScreen™ (Cambridge, Reino Unido) para identificar la presencia y la potencia de los epítomos de linfocitos T dentro de la α -sarcina de tipo silvestre. Brevemente, se sometieron a ensayo 46 péptidos pentadecaméricos que se solapaban por 12 aminoácidos y que abarcaban la α -sarcina de tipo silvestre para determinar la proliferación contra 50 donadores de CMSP sanos seleccionados para representar mejor la propagación de alelos HLA-DR en la población. A partir de este análisis, se identificaron dos epítomos de linfocitos T dentro de la α -sarcina de tipo silvestre, como se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

SEQ ID NO	EPÍTOMOS DE LINFOCITOS T IDENTIFICADOS MEDIANTE EPISCREEN™
5	QKNPKTNKY (Epítomo de Sarcina 1)
4	IIAHTKENQ (Epítomo de Sarcina 2)

El epítomo de sarcina 1 corresponde a los restos de aminoácidos 10-18 de la α -sarcina de tipo silvestre dentro de la región N-terminal de 22 aminoácidos implicada en la membrana y la interacción y la unión de la α -sarcina al

ribosoma. El epítipo de sarcina 1 puede incluir opcionalmente el aminoácido N-terminal inmediatamente adyacente (resto de anclaje P-1) y, por tanto, puede comprender la secuencia de aminoácidos DQKNPKTNKY (SEQ ID NO: 6) correspondiente a los aminoácidos 9-18 de la α -sarcina de tipo silvestre.

5 El Epítipo de Sarcina 1 puede modificarse para reducir o eliminar la unión del CMH de clase II humano. En una realización, el Epítipo de Sarcina 1 modificado tiene una o más mutaciones en uno o más de los restos de anclaje del CMH de clase II P-1, P1, P4, P6, P7 o P9 de Epítipo de Sarcina 1, donde el resto de anclaje P-1 corresponde al aminoácido (D) directamente N-terminal con respecto al Epítipo de Sarcina 1 en la α -sarcina de tipo silvestre. En otra realización, el Epítipo de Sarcina 1 modificado tiene una o más de las siguientes sustituciones: P-1 en el resto D9: D9T o D9A; anclaje P1 en el resto Q10: Q10K, Q10R o Q10A; anclaje P4 en el resto P13: P13I; anclaje P6 en el resto T15: T15G, T15Q o T15H; resto de anclaje P7 en N16: N16R, N16K, N16A; y/o anclaje P9 en el resto Y18: Y18H, Y18K o Y18R. Dicho de otra forma, el Epítipo de Sarcina 1 modificado tiene la secuencia de aminoácidos de $X_1X_2KNX_3KX_4X_5KX_6$, en donde X_1 es D, A o T; X_2 es Q, K, R o A; X_3 es P o I; X_4 es T, G, Q o H; X_5 es N, R, K o A; y X_6 es Y, H, K o R (SEQ ID NO: 7).

15 Además de modificar uno o más restos de anclaje, también es posible modificar uno o más restos no de anclaje en el Epítipo de Sarcina 1 a condición de que el epítipo modificado conserve la unión reducida del CMH de clase II en comparación con la α -sarcina de tipo silvestre. Una alineación del Epítipo de Sarcina 1 con el epítipo correspondiente en otras ribotoxinas fúngicas relacionadas proporciona orientación en cuanto a posibles sustituciones de restos no de anclaje. Un experto habitual en la materia podría identificar fácilmente otras sustituciones de restos no de anclaje usando métodos y técnicas convencionales.

20 En otra realización, el Epítipo de Sarcina 1 modificado tiene la secuencia de aminoácidos de $X_1X_2NX_3KX_4X_5KX_6$, en donde X_1 es Q, K, R o A; X_2 es K o L; X_3 es P o I; X_4 es T, G, Q o H; X_5 es N, R, K o A; y X_6 es Y, H, K, R o W (SEQ ID NO: 8). En otra realización más, el Epítipo de Sarcina 1 modificado tiene la secuencia de $X_1X_2X_3NX_4KX_5X_6KX_7$, en donde X_1 es D, A o T; X_2 es Q, K, R o A; X_3 es K o L; X_4 es P o I; X_5 es T, G, Q o H; X_6 es N, R, K o A; y X_7 es Y, H, K, R o W (SEQ ID NO: 9).

30 El Epítipo de Sarcina 2 corresponde a los restos de aminoácidos 134-142 de la α -sarcina de tipo silvestre y, por tanto, abarca H137, que forma parte de la tríada catalítica. El Epítipo de Sarcina 2 puede modificarse para reducir o eliminar la unión del CMH de clase II humano. En una realización, el Epítipo de Sarcina 2 modificado tiene una o más mutaciones en uno o más de los restos de anclaje del CMH de clase II P1, P6, P7 o P9 del Epítipo de Sarcina 2. En otra realización, el Epítipo de Sarcina 2 modificado tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto I134: I134A; anclaje P6 en el resto K139: K139D, K139E, K139G, K139Q, K139H o K139N; resto de anclaje P7 en E140: E140D; y/o anclaje P9 en el resto Q142: Q142D, Q142N, Q142T, Q142E, Q142R o Q142G. Dicho de otra forma, el Epítipo de Sarcina 2 modificado tiene la secuencia de aminoácidos de $X_1IAHTX_2X_3NX_4$, en donde X_1 es I o A; X_2 es K, D, E, G, Q, H o N; X_3 es E o D; y X_4 es Q, D, N, T, E, R o G (SEQ ID NO: 10).

40 Además de modificar uno o más restos de anclaje, también es posible modificar uno o más restos no de anclaje en el Epítipo de Sarcina 2 a condición de que el epítipo modificado conserve la unión reducida del CMH de clase II en comparación con la α -sarcina de tipo silvestre. Una alineación del Epítipo de Sarcina 2 con el epítipo correspondiente en otras ribotoxinas fúngicas relacionadas proporciona orientación en cuanto a posibles sustituciones de restos no de anclaje. Un experto habitual en la materia podría identificar fácilmente otras sustituciones de restos no de anclaje usando métodos y técnicas convencionales.

45 En otra realización, el Epítipo de Sarcina 2 modificado tiene la secuencia de aminoácidos de $X_1X_2AHX_3X_4X_5NX_6$, en donde X_1 es I o A; X_2 es I o V; X_3 es T o Q; X_4 es K, D, E, G, Q, H o N; X_5 es E o D; y X_6 es Q, D, N, T, E, R o G (SEQ ID NO: 11).

50 Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría o mecanismo, se cree que las mutaciones que reducen o eliminan la unión del CMH de clase II humano como se describe en el presente documento pueden ayudar a reducir o eliminar la inmunogenia de la α -sarcina de tipo silvestre en seres humanos (por ejemplo, a través de la reducción del número y/o la inmunogenia de epítipos de linfocitos T).

55 En algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende al menos un epítipo de linfocitos T menos en comparación con la α -sarcina de tipo silvestre (o al menos dos epítipos de linfocitos T menos, al menos tres epítipos de linfocitos T menos, etc.). Por ejemplo, si la α -sarcina de tipo silvestre comprende dos epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T. O, si la α -sarcina de tipo silvestre comprende tres epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende dos epítipos de linfocitos T, un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T. O, si la α -sarcina de tipo silvestre comprende diez epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende nueve epítipos de linfocitos T, ocho epítipos de linfocitos T, siete epítipos de linfocitos T, seis epítipos de linfocitos T, cinco epítipos de linfocitos T, cuatro epítipos de linfocitos T, tres epítipos de linfocitos T, dos epítipos de linfocitos T, un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T. O, si la α -sarcina de tipo silvestre comprende ocho epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende siete epítipos de linfocitos T, seis epítipos de linfocitos T, cinco

epítomos de linfocitos T, cuatro epítomos de linfocitos T, tres epítomos de linfocitos T, dos epítomos de linfocitos T, un epítomo de linfocitos T o cero epítomos de linfocitos T. O, si la α -sarcina de tipo silvestre comprende seis epítomos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende cinco epítomos de linfocitos T, cuatro epítomos de linfocitos T, tres epítomos de linfocitos T, dos epítomos de linfocitos T, un epítomo de linfocitos T o
 5 cero epítomos de linfocitos T. O, si la α -sarcina de tipo silvestre comprende cuatro epítomos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende tres epítomos de linfocitos T, dos epítomos de linfocitos T, un epítomo de linfocitos T o cero epítomos de linfocitos T.

Más específicamente, la molécula de sarcina modificada puede comprender al menos una mutación en comparación
 10 con una α -sarcina "parental", siendo la α -sarcina parental al menos una porción de la α -sarcina de tipo silvestre (por ejemplo, α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.). En una realización, la al menos una mutación comprende una mutación de un epítomo de linfocitos T, por ejemplo, da como resultado que el epítomo tenga una capacidad reducida para unirse a moléculas del CMH de clase II o que no tenga capacidad para unirse a moléculas del CMH de clase II, o da como resultado una molécula de sarcina modificada que desencadena una
 15 respuesta de linfocitos T reducida en comparación con la α -sarcina de tipo silvestre correspondiente. Por ejemplo, la al menos una mutación puede estar dentro del Epítomo de Sarcina 1 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) y/o dentro del Epítomo de Sarcina 2 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 4).

En algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende al menos una mutación en comparación con
 20 una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.), en donde al menos una mutación comprende una mutación de al menos uno de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 (de α -sarcina de tipo silvestre).

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende una o más de las siguientes
 25 mutaciones en comparación con una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.): D9T, D9A, Q10K, Q10R, Q10A, P13I, T15G, T15Q, T15H, N16R, N16K, N16A, Y18H, Y18K o Y18R.

En algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende al menos una mutación en comparación con
 30 una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.), en donde la al menos una mutación comprende una mutación de al menos uno de los aminoácidos 1134, K139, E140 o Q142.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende una o más de las siguientes
 35 mutaciones en comparación con una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.): I134A, K139D, K139E, K139G, K139Q, K139H, K139N, E140D, Q142D, Q142N, Q142T, Q142E, Q142R o Q142G.

En otras realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende una primera y una segunda mutación en
 40 comparación con una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.), en donde la primera mutación comprende una mutación de al menos uno de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 (de α -sarcina de tipo silvestre) y en donde la segunda mutación comprende una mutación de al menos uno de los aminoácidos 1134, K139, E140 o Q142 (de α -sarcina de tipo silvestre). Por ejemplo, en determinadas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende una o más de las siguientes mutaciones
 45 en comparación con una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.): una primera mutación en Q10 y una segunda mutación en K139 o Q142; una primera mutación en N16 y una segunda mutación en K139 o Q142; o una primera mutación en Y18 y una segunda mutación en K139 o Q142.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende una primera mutación en
 50 comparación con una α -sarcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en donde la primera mutación se selecciona entre D9T, D9A, Q10K, Q10R, Q10A, P13I, T15G, T15Q, T15H, N16R, N16K, N16A Y18H, Y18K o Y18R y una segunda mutación en comparación con una α -sarcina de tipo silvestre, en donde la segunda mutación se selecciona entre I134A, K139D, K139E, K139G, K139Q, K139H, K139N, E140D, Q142D, Q142N, Q142T, Q142E, Q142R o Q142G.
 55

En otras realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende una o más de las siguientes mutaciones en
 60 comparación con una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.): una primera mutación que comprende Q10K y una segunda mutación que comprende K139D, K139E, Q142N o Q142T; una primera mutación que comprende N16R y una segunda mutación que comprende K139D, K139E, Q142N o Q142T; una primera mutación que comprende N16K y una segunda mutación que comprende K139D, K139E, Q142N o Q142T; una primera mutación que comprende Y18K y una segunda mutación que comprende K139D, K139E, Q142N o Q142T; o una primera mutación que comprende Y18R y una segunda mutación que comprende K139D, K139E, Q142N o Q142T.

En otras realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende tres mutaciones en comparación con una α -
 65 sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.). Por

ejemplo, la molécula de sarcina modificada puede comprender una primera y una segunda mutación dentro del Epítopo de Sarcina 1 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) y una tercera mutación dentro del Epítopo de Sarcina 2 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 4). Como alternativa, la molécula de sarcina modificada puede comprender una primera mutación dentro del Epítopo de Sarcina 1 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) y una segunda y una tercera mutación dentro del Epítopo de Sarcina 2 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 4).

En determinadas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende una o más de las siguientes mutaciones en comparación con una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.): una primera mutación en el aminoácido Q10 o N16, una segunda mutación en K139 y una tercera mutación en Q142. En una realización, la primera mutación en Q10 o N16 se selecciona entre Q10K, Q10R o Q10A o N16R, N16K o N16A (preferentemente Q10K o N16R). En otra realización, la segunda mutación en K139 se selecciona entre K139D, K139E, K139G, K139Q, K139H o K139N (preferentemente K139D o K139E). En otra realización, la tercera mutación en Q142 se selecciona entre Q142D, Q142N, Q142T, Q142E, Q142R o Q142G (preferentemente Q142T).

En otra realización más, la primera mutación es Q10K o N16R, la segunda mutación es K139E o K139D y la tercera mutación es Q142T. En otra realización, la primera mutación es Q10K, la segunda mutación es K139E y la tercera mutación es Q142T. En otra realización, la primera mutación es Q10K, la segunda mutación es K139D y la tercera mutación es Q142T. En otra realización, la primera mutación es N16R, la segunda mutación es K139E y la tercera mutación es Q142T. En otra realización, la primera mutación es N16R, la segunda mutación es K139D y la tercera mutación es Q142T.

En otras realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende cuatro mutaciones en comparación con una α -sarcina "parental" (por ejemplo, una α -sarcina de tipo silvestre, un fragmento de α -sarcina de tipo silvestre, etc.). Por ejemplo, la molécula de sarcina modificada puede comprender dos mutaciones dentro del Epítopo de Sarcina 1 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) y dos mutaciones dentro del Epítopo de Sarcina 2 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 4); una mutación dentro del Epítopo de Sarcina 1 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) y tres mutaciones dentro del Epítopo de Sarcina 2 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 4); o tres mutaciones dentro del Epítopo de Sarcina 1 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6) y una mutación dentro del Epítopo de Sarcina 2 de Linfocitos T (SEQ ID NO: 4).

En otra realización más, el polipéptido de sarcina modificado comprende al menos una mutación en comparación con un polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en donde la secuencia de aminoácidos del polipéptido de sarcina modificado comprende:

AVTWTCLNX₁X₂ KNX₃KX₄X₅KX₆ET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGX₇IAHTX₈X₉ NX₁₀GELKLC SH, en donde de X₁ a X₁₀ pueden ser cualquier aminoácido (SEQ ID NO: 12), a condición de que el polipéptido de sarcina modificado no sea idéntico al polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1).

En otra realización, X₁ es D, A o T; X₂ es Q, K, R o A; X₃ es P o I; X₄ es T, G, Q o H; X₅ es N, R, K o A; X₆ es Y, H, K o R; X₇ es I o A; X₈ es K, D, E, G, Q, H o N; X₉ es E o D; y X₁₀ es Q, D, N, T, E, R o G (SEQ ID NO: 13).

La Tabla 4 describe ejemplos no limitantes de moléculas de sarcina modificadas. Las moléculas de sarcina modificadas en la Tabla 4 comprenden una o más de las sustituciones de aminoácidos descritas anteriormente.

TABLA 4

SEQ ID NO:	Variante
14	Q10X (X = K o A) AVTWTCLNDX KNPKTNKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTKE NQGELKLC SH
15	N16X (X = R, K o A) AVTWTCLNDQ KNPKTXYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTKE NQGELKLC SH

(continuación)

SEQ ID NO:	Variante
16	Y18X (X= K o R) AVTWTCLNDQ KNPKTNK <u>X</u> ET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTKE N <u>Q</u> GELKLC SH
17	K139X (X= D o E) AVTWTCLNDQ KNPKTNKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTX <u>E</u> NQGELKLC SH
18	E140D AVTWTCLNDQ KNPKTNKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTK <u>D</u> NQGELKLC SH
19	Q142X (X= N, T o E) AVTWTCLNDQ KNPKTNKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTKE N <u>X</u> GELKLC SH
20	Q10K + K139X (X= D o E) AVTWTCLND <u>K</u> KNPKTNKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTX <u>E</u> NQGELKLC SH
21	N16R + K139X (X= D o E) AVTWTCLNDQ KNPKTR <u>K</u> YET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTX <u>E</u> NQGELKLC SH
22	Y18X₁ (X₁= K o R) + K139X₂ (X₂= D o E) AVTWTCLNDQ KNPKTNK <u>X</u> ₁ ET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTX <u>2</u> E NQGELKLC SH
23	Q10K + Q142T AVTWTCLND <u>K</u> KNPKTNKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHTKE N <u>T</u> GELKLC SH
46	Q10K + K139D + Q142T AVTWTCLND <u>K</u> KNPKTNKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTYPNKV FCGIIAHT <u>D</u> E N <u>T</u> GELKLC SH

(continuación)

SEQ ID NO:	Variante
47	Q10K + K139E + Q142T AVTWTCLNDK KNPKTNKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTPNKV FCGIIAHT <u>EE</u> NTGELKLC SH
48	N16R + K139D + Q142T AVTWTCLNDQ KNPKTRKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTPNKV FCGIIAHT <u>DE</u> NTGELKLC SH
49	N16R + K139E + Q142T AVTWTCLNDQ KNPKTRKYET KRLLYNQNKA ESNSHHAPLS DGKTGSSYPH WFTNGYDGDG KLPKGRTPIK FGKSDCDRPP KHSKDGNGKT DHYLLEFPTF PDGHDYKFDS KKPENPGPA RVIYTPNKV FCGIIAHT <u>EE</u> NTGELKLC SH

La modificación de la α -sarcina de tipo silvestre puede incluir una sustitución de aminoácidos como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una sustitución de 1 aminoácido (por ejemplo, Q10A), una sustitución de 2 aminoácidos (por ejemplo, Q10A y Q142G), una sustitución de 3 aminoácidos (por ejemplo, Q10A, N16A, Q142G), una sustitución de 4 aminoácidos, una sustitución de 5 aminoácidos, una sustitución de 6 aminoácidos, una sustitución de 7 aminoácidos, una sustitución de 8 aminoácidos, una sustitución de nueve aminoácidos, una sustitución de 10 aminoácidos o una sustitución de más de 10 aminoácidos.

La modificación de la α -sarcina de tipo silvestre no se limita a una sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, la modificación puede incluir una supresión de aminoácidos o una adición de aminoácidos. En algunas realizaciones, la supresión de aminoácidos es una supresión de 1 aminoácido, una supresión de 2 aminoácidos, una supresión de 3 aminoácidos, una supresión de 4 aminoácidos, una supresión de 5 aminoácidos, una supresión de 6 aminoácidos, una supresión de 7 aminoácidos, una supresión de 8 aminoácidos, una supresión de nueve aminoácidos, una supresión de 10 aminoácidos o una supresión de más de 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, la adición de aminoácidos es una adición de 1 aminoácido, una adición de 2 aminoácidos, una adición de 3 aminoácidos, una adición de 4 aminoácidos, una adición de 5 aminoácidos, una adición de 6 aminoácidos, una adición de 7 aminoácidos, una adición de 8 aminoácidos, una adición de nueve aminoácidos, una adición de 10 aminoácidos o una adición de más de 10 aminoácidos. Las supresiones y/o adiciones pueden corresponder opcionalmente a supresiones en regiones de la molécula distintas de las regiones de epítomos de linfocitos T.

La α -sarcina de tipo silvestre comprende dos enlaces disulfuro (entre los aminoácidos Cys 6 y Cys 148 y entre los aminoácidos Cys 76 y Cys 132). En algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada comprende un enlace disulfuro adicional. En algunas realizaciones, el enlace disulfuro adicional puede añadirse en sitios adyacentes a los sitios de enlace disulfuro de tipo silvestre. En algunas realizaciones, se incorporan enlaces disulfuro adicionales en la molécula mediante la adición de aminoácidos. En algunas realizaciones, se incorporan enlaces disulfuro en la molécula mediante sustitución de aminoácidos. En algunas realizaciones, la molécula de sarcina modificada no tiene enlaces disulfuro.

La modificación de la α -sarcina de tipo silvestre puede incluir una sustitución de aminoácidos (como se ha descrito anteriormente) y una modificación adicional, por ejemplo, una supresión, una adición, un truncamiento (por ejemplo, truncamiento N-terminal, truncamiento C-terminal) o una combinación de los mismos.

OTRAS MOLECULAS DE RIBOTOXINA FÚNGICA MODIFICADAS

Como se ha analizado anteriormente, además de la α -sarcina, existen otros miembros de la familia de ribotoxinas relacionados producidos por otras especies de *Aspergillus*, incluyendo clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina. La Tabla 5 muestra las secuencias correspondientes a clavina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 24), gigantina (SEQ ID NO: 25), mitogilina (SEQ ID NO: 26) y restrictocina (SEQ ID NO: 45). Las moléculas de clavina, gigantina, mitogilina

y restrictocina modificadas de la presente divulgación derivan de una clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina "parental", respectivamente, por ejemplo, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina de tipo silvestre, o fragmentos de clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina de tipo silvestre.

5

TABLA 5

SEQ ID NO	CLAVINA DE TIPO SILVESTRE
24	AATWTCMNEQKNPKTNKYENKRLLYNQNNNAESNAHHAPLSDGKTGSSYPHW FTNGYDGDGKILKGRTP IKWGNSDCDRPPKHSKNGDGKNDHYLLEFPTFPD GHQYNFDSKKPKEDPGPARVIYTYPNKVFCGIVAHTRENQGDLLKCSH
SEQ ID NO	GIGANTINA DE TIPO SILVESTRE
25	AVTWTCLNEQKNIKTNKYETKRLLYNQDKAESNSHHAPLSDGKTGSSYPHW FTNGYDGEKILKGRTP IKFGKSDCDRPPKHSKNGDGKNDHYLLEFPTFPD GHDYKFDSKKPKEDPGPARVIYTYPNKVFCGIIAHTRENQGELKLC SH
SEQ ID NO	MITOGILINA DE TIPO SILVESTRE
26	ATWTCINQQLNPKTNKWEDKRLLYSQAKAESNSHHAPLSDGKTGSSYPHWF TNGYDGNGLIKGRTP IKFGKADCDRPPKHSQNGMGKDDHYLLEFPTFPDG HDYKFDSKKPKEDPGPARVIYTYPNKVFCGIVAHQGRGNQGDLLR LCSH
SEQ ID NO	RESTRICTOCINA DE TIPO SILVESTRE
45	ATWTCINQQLNPKTNKWEDKRLLYSQAKAESNSHHAPLSDGKTGSSYPHWF TNGYDGNGLIKGRTP IKFGKADCDRPPKHSQNGMGKDDHYLLEFPTFPDG HDYKFDSKKPKENPGPARVIYTYPNKVFCGIVAHQGRGNQGDLLR LCSH

Un ejemplo de un método rápido para el análisis de la inmunogenia de una molécula de proteína implica la predicción de la unión de péptidos a moléculas del CMH de clase II humano. Aunque solo una proporción de péptidos que se unen al CMH de clase II serán epítomos de linfocitos T reales, el análisis de la unión de péptidos al CMH de clase II puede proporcionar un análisis rápido del potencial de inmunogenia de una secuencia proteínica porque los epítomos de linfocitos T CD4+ se unen al CMH de clase II. Además, se ha demostrado que los péptidos de unión al CMH de clase II de afinidad alta promiscuos se correlacionan con la presencia de epítomos de linfocitos T (Hill et al., 2003, *Arthritis Res Ther*, 1: R40-R48) y, por tanto, el análisis de dichos péptidos de unión promiscuos proporciona una base para el análisis de epítomos de linfocitos T "posibles".

Se han desarrollado métodos informáticos para modelar dichas interacciones, tales como iTope (Perry et al., 2008, *Drugs in R&D*, 9 (6) 385-396), que se basa en el software Peptide Threading (documento WO 02/069232, documento WO 98/59244). En iTope, se someten a ensayo individualmente noámeros solapados de una secuencia de interés para la interacción con 34 alotipos DR diferentes del CMH de clase II humano y se puntúa individualmente basándose en su ajuste e interacciones con cada una de las moléculas del CMH de clase II. Para cada alotipo del CMH, la fuerza combinada de las interacciones puede proporcionar una predicción de la fuerza de la unión física de cada péptido noamérico y la designación de péptidos de unión de afinidad alta. Mediante el análisis colectivo de la unión de un noámero a los 34 alotipos del CMH de clase II, puede determinarse el alcance de la unión promiscua o restringida. Esto permite la identificación de péptidos de unión al CMH de clase II de afinidad alta promiscuos que, por tanto, se considera que tienen un potencial alto para tener actividades de epítomos de linfocitos T.

Las secuencias de aminoácidos de tipo silvestre de clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina se analizaron en busca de ligantes del CMH de clase II no humano. Todos los noámeros solapados de las secuencias de ribotoxina de tipo silvestre se enhebraron a través de una base de datos de 34 alotipos DR del CMH de clase II humano y se puntuaron individualmente basándose en su ajuste e interacciones con cada una de las moléculas del CMH de clase II. La unión prevista al CMH de clase II donde la posición del primer resto de un péptido noamérico que se une al alotipo del CMH de clase II ("ancla p1") tiene una puntuación de unión de 0,55-0,6 o una puntuación de unión fue >0,6. Las regiones que contienen péptidos potencialmente inmunógenos se indican como "Altamente Promiscuas" y "Moderadamente Promiscuas". Los péptidos de unión al CMH "Altamente Promiscuos" se definen como el 50 % de los alelos totales y de los alelos de afinidad alta que se unen al CMH de clase II. Los péptidos de unión al CMH "Moderadamente Promiscuos" se definen como el 50 % de los alelos totales que se unen al CMH de clase II pero <50 % de los alelos de afinidad alta que se unen al CMH de clase II.

Los resultados de este trabajo sugieren que la clavina de tipo silvestre contiene varios epítomos de linfocitos T posibles, incluyendo un péptido de unión al CMH de afinidad alta promiscuo con anclaje p1 en el resto 134 (I/isleucina) y tres péptidos de unión al CMH de afinidad moderada promiscuos con anclajes p1 en los restos 63 (L/leucina), 122 (V/valina) y 130 (V/valina) (véase la Tabla 6). También se identificaron epítomos posibles de linfocitos T poco o muy poco inmunógenos.

TABLA 6

SEQ ID NO	EPÍTOPOS DE LINFOCITOS T DE CLAVINA POSIBLES
27	Péptido de unión al CMH de afinidad alta promiscuo con anclaje p1 I134 IVAHTRENQ
28	Péptido de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con anclaje p1 L63 LKGRTPIKW
3	Péptido de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con anclaje p1 V122 VIYTYPNKV
29	Péptido de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con anclaje p1 V130 VFCGIVAHT

Además, el ensayo de inmunogenia EpiScreen™ (Cambridge, Reino Unido) de α -sarcina sugiere que la clavina contiene el siguiente epítipo de linfocitos T que tiene un resto de anclaje p1 de Q10: QKNPKTNKY (SEQ ID NO: 5).

El trabajo por ordenador también sugiere que la gigantina de tipo silvestre contiene varios epítipos de linfocitos T posibles, incluyendo dos péptidos de unión al CMH de afinidad alta promiscuos con anclajes p1 en los restos 63 (L/leucina) y 122 (V/valina) (véase la Tabla 7). También se identificaron epítipos posibles de linfocitos T poco o muy poco inmunógenos.

TABLA 7

SEQ ID NO	EPÍTOPOS DE LINFOCITOS T DE GIGANTINA POSIBLES
30	Péptido de unión al CMH de afinidad alta promiscuo con anclaje p1 L63 LKGRTPIKF
3	Péptido de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con anclaje p1 V122 VIYTYPNKV

Además, el análisis de inmunogenia EpiScreen™ (Cambridge, Reino Unido) de α -sarcina sugiere que la gigantina contiene los siguientes dos epítipos de linfocitos T que tienen restos de anclaje p1 de Q10 y I134, respectivamente: QKNIKTNKY (SEQ ID NO: 31) y IIAHTRENQ (SEQ ID NO: 32).

El trabajo por ordenador también sugiere que la mitogilina y la restrictocina de tipo silvestre, que son variantes de la misma proteína aislada de *Aspergillus restrictus*, contienen varios epítipos de linfocitos T posibles, incluyendo tres péptidos de unión al CMH de afinidad alta promiscuos con anclajes p1 en los restos 62 (I/soleucina), 129 (V/valina) y 133 (I/soleucina) y un único péptido de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con un anclaje p1 en el resto 121 (V/valina) (véase la Tabla 8). También se identificaron epítipos posibles de linfocitos T poco o muy poco inmunógenos.

TABLA 8

SEQ ID NO	EPÍTOPOS DE LINFOCITOS T DE MITOGILINA/RESTRICTOCINA POSIBLES
33	Péptido de unión al CMH de afinidad alta promiscuo con anclaje p1 I62 IKGRTPIKF
34	Péptido de unión al CMH de afinidad alta promiscuo con anclaje p1 V129 VFCGIVAHQ
35	Péptido de unión al CMH de afinidad alta promiscuo con anclaje p1 I133 IVAHQGRNQ
3	Péptido de unión al CMH de afinidad moderada promiscuo con anclaje p1 V121 VIYTYPNKV

Además, el análisis de inmunogenia EpiScreen™ (Cambridge, Reino Unido) de α -sarcina sugiere que la mitogilina y la restrictocina contienen el siguiente epítipo de linfocitos T que tiene un resto de anclaje p1 de Q10: QLNPKNKW (SEQ ID NO: 36).

Los epítipos de linfocitos T de clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina identificados anteriormente pueden modificarse para reducir o eliminar la unión al CMH de clase II humano. En una realización, el epítipo de linfocitos T de clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina modificado tiene una o más mutaciones en uno o más de los restos de anclaje del CMH de clase II P1, P4, P6, P7 o P9.

En una realización, el epítipo de clavina o gigantina modificado con anclaje p1 Q10 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto Q10: Q10K, Q10R o Q10A; anclaje P4 en el resto P13 (solo para clavina): P13I; anclaje P6 en el resto T15: T15G, T15Q o T15H; resto de anclaje P7 en N16: N16R, N16K o N16A; y/o anclaje P9 en el resto Y18: Y18H, Y18K o Y18R.

En otra realización, el epítipo de mitogilina o restrictocina modificado con anclaje p1 Q9 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto Q9: Q9K, Q9R o Q9A; anclaje P4 en el resto P12: P12I; anclaje P6 en el resto T14: T14G, T14Q o T14H; resto de anclaje P7 en N15: N15R, N15K o N15A; y/o anclaje P9 en el resto Y17: Y17H, Y17K o Y17R.

En otra realización, el epítipo de clavina modificado con anclaje p1 L63 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto L63: L63A o L63D; anclaje P4 en el resto R66: R66G, R66Q, R66H, R66N, R66D, R66E; resto de anclaje P7 en I69: I69A o I69D; y/o anclaje P9 en el resto W71: W71G, W71A, W71 D o W71E.

En otra realización, el epítipo de gigantina modificado con anclaje p1 L63 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto L63: L63A o L63D; anclaje P4 en el resto R66: R66G, R66Q, R66H, R66N, R66D, R66E; resto de anclaje P7 en I69: I69A o I69D; y/o anclaje P9 en el resto F71: F71G, F71A, F71 D o F71 E.

ES 2 765 302 T3

5 En otra realización, el epítipo de mitogilina o restrictocina modificado con anclaje p1 162 o tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto I62: I62A o I62D; anclaje P4 en el resto R65: R65G, R65Q, R65H, R65N, R65D, R65E; resto de anclaje P7 en I68: I68A o I68D; y/o anclaje P9 en el resto F70: F70G, F70A, F70D o F70E.

10 En otra realización, el epítipo de clavina o gigantina modificado con anclaje p1 V122 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto V122: V122A, V122K o V122R; anclaje P4 en el resto T125: T125G, T125Q o T125H; anclaje P6 en el resto P127: P127I; resto de anclaje P7 en N128: N128R, N128K o N128A; y/o anclaje P9 en el resto V130: V130A, V130K o V130R.

15 En otra realización, el epítipo de mitogilina o restrictocina modificado con anclaje p1 V121 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto V121: V121A, V121K o V121R; anclaje P4 en el resto T124: T124G, T124Q o T124H; anclaje P6 en el resto P126: P126I; resto de anclaje P7 en N127: N127R, N127K o N127A; y/o anclaje P9 en el resto V129: V129A, V129K o V129R.

20 En otra realización, el epítipo de clavina modificado con anclaje p1 V130 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto V130: V130A, V130K o V130R; anclaje P4 en el resto G133: G133A, G133D, G133E o G133K; resto de anclaje P7 en A136: A136R, A136K o A136D; y/o anclaje P9 en el resto T138: T138G o T138H.

25 En otra realización, el epítipo de mitogilina o restrictocina modificado con anclaje p1 V129 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto V129: V129A, V129K o V129R; anclaje P4 en el resto G132: G132A, G132D, G132E o G132K; resto de anclaje P7 en A135: A135R, A135K o A135D; y/o anclaje P9 en el resto Q137: Q137G o Q137H.

30 En otra realización, el epítipo de clavina modificado con anclaje p1 1134 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto I134: I134A; anclaje P6 en el resto R139: R139D, R139E, R139G, R139Q, R139H o R139N; resto de anclaje P7 en E140: E140D; y/o anclaje P9 en el resto Q142: Q142D, Q142N, Q142T, Q142E, Q142R o Q142G.

35 En otra realización, el epítipo de mitogilina o restrictocina modificado con anclaje p1 1133 tiene una o más de las siguientes sustituciones: anclaje P1 en el resto I133: I133A; anclaje P6 en el resto R138: R138D, R138E, R138G, R138Q, R138H o R138N; resto de anclaje P7 en G139: G139D; y/o anclaje P9 en el resto Q141: Q141D, Q141N, Q141T, Q141E, Q141R o Q141G.

40 Además de modificar uno o más restos de anclaje, también es posible modificar uno o más restos no de anclaje en los epítipos de linfocitos T de clavina, gigantina, mitogilina y restrictocina identificados anteriormente, a condición de que el epítipo modificado conserve la unión al CMH de clase II reducida en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente.

45 En algunas realizaciones, el epítipo de linfocitos T modificado es parte de una molécula de ribotoxina modificada (por ejemplo, molécula de clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina modificada), donde la molécula de ribotoxina modificada comprende al menos un epítipo de linfocitos T menos en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente (o al menos dos epítipos de linfocitos T menos, al menos tres epítipos de linfocitos T menos, etc.). Por ejemplo, si la ribotoxina de tipo silvestre comprende dos epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina modificada comprende un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T. O, si la ribotoxina de tipo silvestre comprende tres epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina modificada comprende dos epítipos de linfocitos T, un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T. O, si la ribotoxina de tipo silvestre comprende diez epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina modificada comprende nueve epítipos de linfocitos T, ocho epítipos de linfocitos T, siete epítipos de linfocitos T, seis epítipos de linfocitos T, cinco epítipos de linfocitos T, cuatro epítipos de linfocitos T, tres epítipos de linfocitos T, dos epítipos de linfocitos T, un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T. O, si la ribotoxina de tipo silvestre comprende ocho epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina modificada comprende siete epítipos de linfocitos T, seis epítipos de linfocitos T, cinco epítipos de linfocitos T, cuatro epítipos de linfocitos T, tres epítipos de linfocitos T, dos epítipos de linfocitos T, un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T. O, si la ribotoxina de tipo silvestre comprende seis epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina modificada comprende cinco epítipos de linfocitos T, cuatro epítipos de linfocitos T, tres epítipos de linfocitos T, dos epítipos de linfocitos T, un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T. O, si la ribotoxina de tipo silvestre comprende cuatro epítipos de linfocitos T, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina modificada comprende tres epítipos de linfocitos T, dos epítipos de linfocitos T, un epítipo de linfocitos T o cero epítipos de linfocitos T.

65 Más específicamente, la molécula de ribotoxina modificada (por ejemplo, molécula de clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina modificada) puede comprender al menos una mutación en comparación con una ribotoxina "parental", siendo la ribotoxina parental al menos una porción de ribotoxina de tipo silvestre (por ejemplo, clavina, gigantina,

mitogilina o restrictocina de tipo silvestre, un fragmento de clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina de tipo silvestre, etc.). En una realización, la al menos una mutación comprende una mutación de un epítipo de linfocitos T, por ejemplo, da como resultado que el epítipo tenga una capacidad reducida para unirse a moléculas de CMH de clase II o que no tenga capacidad para unirse a moléculas de CMH de clase II.

5 Más específicamente, la molécula de ribotoxina modificada puede comprender al menos una mutación en comparación con una ribotoxina "parental", siendo la ribotoxina parental al menos una porción de ribotoxina de tipo silvestre (por ejemplo, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina de tipo silvestre, un fragmento de clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina de tipo silvestre, etc.). En una realización, la al menos una mutación comprende
10 una mutación de un epítipo de linfocitos T, por ejemplo, da como resultado que el epítipo tenga una capacidad reducida para unirse a moléculas de CMH de clase II o que no tenga capacidad para unirse a moléculas de CMH de clase II. Por ejemplo, la al menos una mutación puede estar dentro de uno o más de los siguientes epítipos de linfocitos T de clavina (SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 5), uno o más de los siguientes epítipos de linfocitos T de gigantina (SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32 y/o
15 SEQ ID NO: 3) o uno o más de los siguientes epítipos de linfocitos T de mitogilina o restrictocina (SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 y/o SEQ ID NO: 3).

En algunas realizaciones, la molécula de clavina modificada comprende al menos una mutación en comparación con una clavina "parental" (por ejemplo, una clavina de tipo silvestre, un fragmento de clavina de tipo silvestre, etc.), en donde al menos una mutación comprende una mutación de al menos uno de los aminoácidos Q10, P13, T15, N16, Y18, L63, R66, I69, W71, V122, T125, P127, N128, V130, G133, I134, A136, T138, R139, E140 o Q142 (de clavina de tipo silvestre).

En otras realizaciones, la molécula de gigantina modificada comprende al menos una mutación en comparación con una gigantina "parental" (por ejemplo, una gigantina de tipo silvestre, un fragmento de gigantina de tipo silvestre, etc.), en donde al menos una mutación comprende una mutación de al menos uno de los aminoácidos Q10, T15, N16, Y18, L63, R66, I69, F71, V122, T125, P127, N128, V130 (de gigantina de tipo silvestre).

En otras realizaciones, la molécula de mitogilina o restrictocina modificada comprende al menos una mutación en comparación con una mitogilina o restrictocina "parental" (por ejemplo, una mitogilina o restrictocina de tipo silvestre, un fragmento de mitogilina o restrictocina de tipo silvestre, etc.), en donde al menos una mutación comprende una mutación de al menos uno de los aminoácidos Q9, P12, T14, N15, Y17, I62, R65, I68, F70, V121, T124, P126, N127, V129, G132, I133, A135, Q137, R138, G139 o Q141 (de mitogilina o restrictocina de tipo silvestre).

35 La modificación de la clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina de tipo silvestre puede incluir una sustitución de aminoácidos como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos es una sustitución de 1 aminoácido (por ejemplo, Q10A), una sustitución de 2 aminoácidos (por ejemplo, Q10A y Q142G), una sustitución de 3 aminoácidos (por ejemplo, Q10A, N16A, Q142G), una sustitución de 4 aminoácidos, una sustitución de 5 aminoácidos, una sustitución de 6 aminoácidos, una sustitución de 7 aminoácidos, una sustitución de 8 aminoácidos, una sustitución de nueve aminoácidos, una sustitución de 10 aminoácidos o una sustitución de
40 más de 10 aminoácidos.

La modificación de la clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina de tipo silvestre no se limita a una sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, la modificación puede incluir una supresión de aminoácidos o una adición de aminoácidos. En algunas realizaciones, la supresión de aminoácidos es una supresión de 1 aminoácido, una supresión de 2 aminoácidos, una supresión de 3 aminoácidos, una supresión de 4 aminoácidos, una supresión de 5 aminoácidos, una supresión de 6 aminoácidos, una supresión de 7 aminoácidos, una supresión de 8 aminoácidos, una supresión de nueve aminoácidos, una supresión de 10 aminoácidos o una supresión de más de 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, la adición de aminoácidos es una adición de 1 aminoácido, una adición de 2 aminoácidos, una adición de 3 aminoácidos, una adición de 4 aminoácidos, una adición de 5 aminoácidos, una adición de 6 aminoácidos, una adición de 7 aminoácidos, una adición de 8 aminoácidos, una adición de nueve aminoácidos, una adición de 10 aminoácidos o una adición de más de 10 aminoácidos. Las supresiones y/o adiciones pueden corresponder opcionalmente a supresiones en regiones de la molécula distintas de las regiones de epítipos de linfocitos T.

55 **RIBOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD**

La molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada puede conservar la citotoxicidad de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. La citotoxicidad puede referirse a la actividad ribonucleolítica hacia un sustrato específico, por ejemplo, un sustrato oligonucleotídico (por ejemplo, el ribosoma), la capacidad de interferir con la síntesis de proteínas en un ensayo basado en células o la actividad de destrucción de células hacia un tipo celular particular. Por ejemplo, un ensayo de citotoxicidad puede medir la capacidad de la toxina para degradar el ribosoma. La citotoxicidad no se limita a las definiciones mencionadas anteriormente.

65 En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o

restrictocina) modificada puede ser tan citotóxica como la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es al menos tan citotóxica como la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. Sorprendentemente se descubrió que en determinadas realizaciones, la molécula de sarcina modificada era más citotóxica que la α -sarcina de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos citotóxica que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos citotóxica en no más del 10 % que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos citotóxica en no más del 15 % que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos citotóxica en no más del 20 % que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada conserva la estructura núcleo de ribotoxina de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. Como se usa en el presente documento, la expresión "estructura núcleo de ribotoxina" se refiere a la disposición de hélices alfa y láminas beta de la ribotoxina de tipo silvestre. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene la misma disposición de hélices alfa que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente, por ejemplo, la estructura general de la hélice alfa permanece igual. En algunas realizaciones, los aminoácidos de la hélice alfa permanecen iguales que los de la ribotoxina de tipo silvestre. Los aminoácidos de la hélice alfa pueden referirse a Glu27-Ala37 (Perez-Canadilas et al., *J Mol Biol* 2009, 299: 1061-73) o Glu26-Ala36 para mitogilina o restrictocina. En algunas realizaciones, pueden modificarse uno o más aminoácidos en la hélice alfa pero la estructura de la hélice alfa todavía se mantiene. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene la misma estructura de la lámina beta que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente, por ejemplo, la estructura general de la lámina beta permanece igual. En algunas realizaciones, los aminoácidos de la lámina beta siguen permaneciendo iguales que los de la ribotoxina de tipo silvestre. En algunas realizaciones, pueden modificarse uno o más aminoácidos en la hélice alfa pero la estructura de la hélice alfa todavía se mantiene. Los aminoácidos de la lámina beta pueden referirse a His50-Phe52 y/o Leu94-Phe97 y/o Ala120-Tyr124 y/o Gly 133-Thr138 y/o Glu144-Leu146 (Perez-Canadilas et al., *J Mol Biol* 2009, 299: 1061-73) o His49-Phe51 y/o Leu93-Phe96 y/o Ala119-Tyr123 y/o Gly 132-Gln138 y/o Asp143-Leu146 en mitogilina o restrictocina. En algunas realizaciones, uno o más de los aminoácidos del sitio activo, por ejemplo, His 50 y/o Glu 96 y/o Arg 121 y/o His137 (o His 49, Glu 95, Arg 120 y/o His 136 en mitogilina o restrictocina) no se modifican en la molécula de ribotoxina modificada. En algunas realizaciones, uno o más de los aminoácidos del sitio activo se modifican.

La molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada puede conservar la ribotoxicidad de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. La ribotoxicidad puede referirse a la actividad ribotóxica (por ejemplo, nucleolítica) hacia un sustrato específico, por ejemplo, sustrato oligonucleotídico (por ejemplo, el ribosoma) o la capacidad de interferir con la síntesis de proteínas en un ensayo basado en células. La ribotoxicidad no se limita a las definiciones mencionadas anteriormente.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada puede ser tan ribotóxica como la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es al menos tan ribotóxica como la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. Sorprendentemente se descubrió que en determinadas realizaciones, la molécula de sarcina modificada es más ribotóxica que la α -sarcina de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos ribotóxica que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos ribotóxica en no más del 10 % que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos ribotóxica en no más del 15 % que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos ribotóxica en no más del 20 % que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente.

Los ensayos de ribotoxicidad y citotoxicidad de sarcina son bien conocidos en la técnica y se describen en Carreras-Sangra et al., 2012, *PEDS* 25, 425-35. Los ensayos convencionales de ribotoxicidad y citotoxicidad incluyen el ensayo de transcripción y traducción *in vitro* (TTIV) que se describe en los Ejemplos de la presente solicitud.

ESTABILIDAD Y SOLUBILIDAD

La estabilidad de una proteína puede determinar la capacidad de la proteína para resistir las condiciones de almacenamiento o transporte. La estabilidad también puede afectar a la semivida de la proteína después de la administración (por ejemplo, en suero). La temperatura de fusión de la proteína o la temperatura a la que la proteína pierde su estructura terciaria, son ejemplos no limitantes de mediciones de la estabilidad física de una proteína.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada conserva la temperatura de fusión de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. (La expresión "conserva la temperatura de fusión" puede referirse a más o menos el 2 %, más o menos el 5 %, más o menos el 10 %). Por ejemplo, una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada conserva la temperatura de fusión de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente si su temperatura de fusión está dentro de más o menos el 5 % de la temperatura de fusión de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión más alta que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión más baja que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión que es inferior en no más de 2 grados a la temperatura de fusión de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión que es inferior en no más de 5 grados a la temperatura de fusión de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión que es inferior en no más de 10 grados a la temperatura de fusión de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión de al menos 40 °C. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión de al menos 50 °C. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión de al menos 60 °C. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión de al menos 65 °C. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión de al menos 70 °C. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una temperatura de fusión de al menos 80 °C. Un experto en la materia conoce bien los protocolos para determinar la temperatura de fusión de dichas proteínas (por ejemplo, véase Gong et al., 2009, *JBC* 284: 21, págs. 14203-14210 y el documento WO 2009/099961A2).

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada conserva la solubilidad de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. (La expresión "conserva la solubilidad" puede referirse a más o menos el 2 %, más o menos el 5 %, más o menos el 10 %). Por ejemplo, una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada conserva la solubilidad de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente si su solubilidad está dentro de más o menos el 5 % de la solubilidad de la ribotoxina de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una solubilidad más alta que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una solubilidad más baja que la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una solubilidad que es inferior en no más del 10 % a la solubilidad de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una solubilidad que es inferior en no más del 15 % a la solubilidad de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada tiene una solubilidad que es inferior en no más del 20 % a la solubilidad de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada o proteína de fusión comprende un marcador. Un marcador puede incluir, pero sin limitación, un marcador His, un marcador flag o similar.

Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría o mecanismo, se cree que la α -sarcina, la clavina, la gigantina, la mitogilina y la restrictocina no son degradadas por proteasas séricas. También se cree que son relativamente resistentes a las proteasas lisosómicas y citosólicas. En algunas realizaciones, la modificación o modificaciones de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) de tipo silvestre para crear la molécula de ribotoxina modificada no afecta a las propiedades de resistencia a proteasas de la ribotoxina de tipo silvestre. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la modificación o modificaciones no añaden un sitio de escisión por proteasas.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada mantiene las propiedades de resistencia a proteasas de la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente (por ejemplo, cuando se somete a proteasas séricas y/o proteasas lisosómicas y/o proteasas citosólicas). En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos resistente a proteasas en no más del 10 % (por ejemplo, cuando se somete a proteasas séricas y/o proteasas lisosómicas y/o citosólicas proteasas) en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos resistente a proteasas en no más del 20 % (por ejemplo, cuando se somete a proteasas séricas y/o proteasas lisosómicas y/o citosólicas proteasas) en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos resistente a proteasas en no más del 30 % (por ejemplo, cuando se somete a proteasas séricas y/o proteasas lisosómicas y/o citosólicas proteasas) en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos resistente a proteasas en no más del 40 % (por ejemplo, cuando se somete a proteasas séricas y/o proteasas lisosómicas y/o citosólicas proteasas) en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es menos resistente a proteasas en no más del 50 % (por ejemplo, cuando se somete a proteasas séricas y/o proteasas lisosómicas y/o citosólicas proteasas) en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente.

20 **PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE RIBOTOXINA**

La presente divulgación también presenta proteínas de fusión de ribotoxina, por ejemplo, proteínas de fusión de ribotoxina que comprenden una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina comprende una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada que tiene inmunogenia reducida en seres humanos en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre correspondiente y una molécula de direccionamiento eficaz para unirse a una diana.

30 La molécula de direccionamiento puede unirse a la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento puede incorporarse en la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une al extremo N-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une al extremo C-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada se une al extremo N-terminal de la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada se une al extremo C-terminal de la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el extremo N-terminal de la molécula de direccionamiento se une al extremo C-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, el extremo N-terminal de la molécula de direccionamiento se une al extremo N-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, el extremo C-terminal de la molécula de direccionamiento se une al extremo C-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, el extremo C-terminal de la molécula de direccionamiento se une al extremo N-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada.

50 **ENLAZADORES**

Los enlazadores pueden usarse opcionalmente para unir la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada y la molécula de direccionamiento en una proteína de fusión. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une al extremo C-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se une al extremo N-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada a través de un enlazador. En algunas realizaciones, la proteína de fusión es un oligómero de moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas y moléculas de direccionamiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende dos moléculas de direccionamiento y una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende dos moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas y una molécula de direccionamiento. Pueden usarse opcionalmente uno o más enlazadores para unir proteínas de fusión para formar un oligómero o para unir componentes dentro de la proteína de fusión.

Los enlazadores pueden afectar a la estructura global de la proteína de fusión y a la accesibilidad de las regiones

funcionales de los componentes de la proteína de fusión. Por ejemplo, se sabe que los restos de prolina doblan o enroscan la estructura de una proteína y, por tanto, un enlazador que comprende uno más restos de prolina puede doblar o enroscar la estructura de la proteína de fusión.

5 Un enlazador, por ejemplo, puede incluir, pero sin limitación, un péptido de diversas longitudes y/o secuencias de aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 0 y 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 0 y 15 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 0 y 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 1 y 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 1 y 15 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 1 y 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 2 y 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 3 y 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 4 y 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 5 y 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 10 y 15 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de entre 15 y 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador tiene una longitud de más de 20 aminoácidos. Las longitudes óptimas pueden variar para emparejar el espaciado y la orientación de la diana o dianas específicas.

El enlazador puede estar codificado en el gen que codifica la proteína de fusión. En algunas realizaciones, el enlazador puede unirse covalentemente (por ejemplo, reticulado) a una porción de la proteína de fusión. Los enlazadores pueden ser enlaces covalentes o no covalentes muy estrechos; conjugación química o fusiones génicas directas de diversas secuencias de aminoácidos, por ejemplo, aquellas (a) ricas en Glicina, Serina, Prolina, Alanina o (b) variantes de secuencias de aminoácidos de enlace de origen natural que conectan dominios de inmunoglobulina.

En algunas realizaciones, el enlazador comprende un componente no peptídico (por ejemplo, un resto de azúcar, un ión de metal pesado, un agente químico tal como un agente químico terapéutico, polietilenglicoles (PEG), por ejemplo, PEG individuales, etc.).

En algunas realizaciones, el dPEG se une a la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada en cualquiera de entre una serina, tirosina, cisteína o lisina de la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, el dPEG se une a un sitio de glucosilación de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, el dPEG se une a la molécula de direccionamiento en cualquiera de entre una serina, tirosina, cisteína o lisina de la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el dPEG se une a un sitio de glucosilación de la molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, el dPEG tiene aproximadamente de 200 a 10.000 daltons.

En algunas realizaciones, el enlazador es un componente de bisagra. Por ejemplo, la molécula de direccionamiento puede comprender un primer componente de media bisagra capaz de unirse a un segundo componente de media bisagra en la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, los componentes de bisagra pueden comprender uno o más dominios multimerizantes. Los dominios multimerizantes pueden configurarse de manera que puedan separarse posteriormente de los componentes de bisagra a través de proteólisis. Podría usarse cualquier proteasa que presente suficiente especificidad para su secuencia de reconocimiento particular diseñada en el enlazador, pero no escinde ninguna otra secuencia en la proteína de fusión.

La escisión puede producirse en el extremo del motivo de reconocimiento, de manera que la molécula de proteína de fusión final no conserve ningún resto de aminoácido adicional que sea parte del sitio de reconocimiento de proteasas. La proteasa puede ser una enzima que tenga poco o ningún efecto en un paciente si se quedan pequeñas cantidades después de la purificación (por ejemplo, Factor X, trombina).

50 Puede encontrarse un ejemplo de un enlazador (o adaptador) escindible en Heisler et al., 2003, *Int. J. Cancer* 103 277-282 y Keller et al., 2001, *J Control Release* 74, 259-261. Por ejemplo, el enlazador (adaptador) comprende un péptido escindible citosólico (PEC), péptido de transferencia de membrana (PTM) y péptido escindible endosómico (PEE). Tras la endocitosis de la proteína de fusión, la escisión enzimática libera el ligando que expone el PTM, lo que permite la translocación al citosol, donde el PTM se libera de la toxina (por ejemplo, sarcina, clavina, gigantina, gigantina, mitogilina o restrictocina) mediante una escisión enzimática del PEC. Las proteínas de fusión de ribotoxina que se describen en el presente documento pueden usar un enlazador escindible similar o diversos componentes de dicho enlazador de este tipo como se describe en las referencias anteriores.

Como se ha analizado anteriormente, la proteína de fusión puede ser un oligómero, por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dímero de moléculas de direccionamiento (o moléculas de direccionamiento múltiples) unido a una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un dímero. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un trímero. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un tetrámero. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es un pentámero. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende más de cinco subunidades. En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede ser un oligómero, por ejemplo, la proteína de fusión puede comprender un dímero de moléculas de ribotoxina (por

ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas (o múltiples moléculas de ribotoxina modificadas) unido a una molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es un dímero. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es un trímero. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es un tetrámero. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada es un pentámero. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada comprende más de cinco subunidades.

Las dos o múltiples moléculas de direccionamiento o las dos o múltiples moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas pueden estar acopladas por un enlazador, en donde el enlazador puede unirse a las moléculas de direccionamiento individuales o moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas en cualquier ubicación apropiada. Los ejemplos de dónde puede unirse un enlazador a las moléculas de direccionamiento incluyen: el extremo C-terminal, el extremo N-terminal, una cisteína que precede o sigue al extremo C-terminal o N-terminal del dominio CH2. En algunas realizaciones, una unión de dos o más moléculas de direccionamiento o moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas (por ejemplo, para formar un dímero, un trímero, etc.) es impulsada por la formación de un enlace disulfuro entre cisteínas.

En algunas realizaciones, Un enlazador puede seleccionarse entre el grupo que consiste en 2-iminotiolano, N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), 4-succinimidiloxycarbonil- α -(2-piridilditio)tolueno (SMPT), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), bis-diazobencidina y glutaraldehído. En algunas realizaciones, un enlazador puede unirse a un grupo amino, un grupo carboxílico, un grupo sulfhidrilo o un grupo hidroxilo de un grupo aminoácido. El grupo amino al que puede unirse un enlazador incluye, por ejemplo, alanina, lisina o prolina. El grupo carboxílico al que puede unirse un enlazador puede ser, por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico. El grupo sulfhidrilo al que puede unirse un enlazador puede ser, por ejemplo, cisteína. El grupo hidroxilo al que puede unirse un enlazador puede ser, por ejemplo, serina, treonina o tirosina. Puede usarse cualquier química de acoplamiento conocida por los expertos en la materia capaz de unir químicamente una molécula de direccionamiento a otra molécula de direccionamiento (o una molécula de direccionamiento a una molécula de ribotoxina modificada).

MOLÉCULAS DE DIRECCIONAMIENTO Y DIANAS

La proteína de fusión comprende moléculas de direccionamiento eficaces para unir una diana. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende un péptido. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un fragmento variable monocatenario (scFv), un nanocuerpo, una abdurina, una molécula de dominio CH2, un fragmento de dominio CH2, una molécula de dominio CH3, un fragmento de dominio CH3, un armazón de proteínas, una hormona, un péptido de unión al receptor, similares o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende un resto de unión, el resto de unión comprende un dominio VH, un dominio VL, un décimo dominio de fibronectina de tipo tres, una proteína de repetición de anquirina modificada por ingeniería genética, un armazón de centrina, un ligando peptídico, un ligando proteínico, un receptor, hormona, una enzima, una citocina, una molécula pequeña, un fragmento de los mismos, similares o una combinación de los mismos. La molécula de direccionamiento no se limita a los ejemplos mencionados anteriormente.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende una región de unión a antígeno. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento es una molécula de dominio CH2 que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 20 kDa. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende al menos un sitio de unión a FcRn funcional. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende múltiples sitios de unión a FcRn (por ejemplo, para la semivida sérica potenciada).

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) es una molécula mono-específica, por ejemplo, la proteína de fusión de ribotoxina es específica para una diana. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina es una molécula biespecífica, por ejemplo, la proteína de fusión de ribotoxina es específica para dos dianas. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina es una molécula triespecífica, por ejemplo, la proteína de fusión de ribotoxina es específica para tres dianas. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina es específica para más de tres dianas.

En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende al menos un primer paratopo específico para un primer epítipo. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende al menos dos primeros paratopos, cada uno específico para un primer epítipo. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende un primer paratopo específico para un primer epítipo y un segundo paratopo específico para un segundo epítipo.

Como se ha analizado anteriormente, la proteína de fusión de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) puede comprender adicionalmente al menos una molécula de direccionamiento adicional. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina comprende adicionalmente una segunda molécula de direccionamiento, por ejemplo, unida a la molécula de direccionamiento o a la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina comprende adicionalmente una tercera molécula de direccionamiento. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina comprende adicionalmente una cuarta molécula de direccionamiento.

En algunas realizaciones, la segunda molécula de direccionamiento se une al extremo N-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada y la molécula apuntada se une al extremo C-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, la segunda molécula de direccionamiento se une al extremo C-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada y la molécula de direccionamiento se une al extremo N-terminal de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada.

En algunas realizaciones, la segunda molécula de direccionamiento comprende un primer paratopo específico para el primer epítipo. En algunas realizaciones, la segunda molécula de direccionamiento comprende un segundo paratopo específico para un segundo epítipo. En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento comprende un tercer paratopo específico para el primer epítipo o un cuarto paratopo específico para un tercer epítipo.

Como se ha analizado anteriormente, la proteína de fusión de ribotoxina puede comprender adicionalmente al menos una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada adicional. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina comprende adicionalmente una segunda molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada. En algunas realizaciones, la segunda molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada se une a la molécula de ribotoxina modificada. En algunas realizaciones, la segunda molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada se une a la molécula de direccionamiento.

La diana puede ser cualquier diana apropiada. Una diana puede incluir una célula, una célula tumoral, una célula inmunitaria, una proteína, un péptido, una molécula, una bacteria, un virus, un protista, un hongo, similares o una combinación de los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una diana es un receptor, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Los ejemplos no limitantes de dianas específicas incluyen el receptor Her2, PMSA, nucleolina, receptores de muerte (por ejemplo, Receptor Fas, receptores de factor de necrosis tumoral, etc.), CD22, CD19, CD79b, DR5, ephA2, Muc1, EGFR, VEGFR, CTLA-4, receptores de superficie celular bacterianos y fúngicos, CD80 y similares.

En algunas realizaciones, la proteína de fusión de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) comprende adicionalmente un reactivo de formación de imágenes, un isótopo, un fármaco, un inmunocnjugado, similares o una combinación de los mismos. El reactivo de formación de imágenes, el isótopo, el fármaco o el inmunocnjugado pueden unirse a la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada y/o a la molécula diana.

45 **PERMEABILIDAD Y RETENCIÓN DE CÉLULAS**

Puede ser beneficioso para la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada (por ejemplo, de una proteína de fusión de ribotoxina) carecer de permeabilidad de membrana (o tener una permeabilidad de membrana reducida en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre). Esto puede permitir que la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada se administre de manera más segura a los pacientes. Por ejemplo, si la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada (por ejemplo, de una proteína de fusión de ribotoxina) se escindiera de la molécula diana, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada no sería captada (o sería menos probable que fuera captada) por una célula que no fuera la célula diana deseada (de acuerdo con la especificidad de la molécula diana de la proteína de fusión de ribotoxina). En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada comprende una mutación en uno o más aminoácidos importantes en la interacción de la membrana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada comprende una mutación en el aminoácido R120 o R121. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada comprende la mutación R120Q o R121Q. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina modificada comprende la mutación R120S o R121S.

65 La mutación de la permeabilidad de la membrana puede no acoplarse necesariamente a una mutación en un sitio de epítipo de linfocitos T. Sin embargo, en algunas realizaciones, la mutación de permeabilidad de la membrana se

acopla a una o múltiples mutaciones en un sitio de epítipo de linfocitos T (mutaciones descritas anteriormente).

5 En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada comprende una mutación que reduce su permeabilidad de membrana pero no reduce su citotoxicidad. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada comprende una mutación que reduce su permeabilidad de membrana pero no reduce su ribotoxicidad (por ejemplo, el direccionamiento y/o la unión al sitio de SRL del ribosoma no se ve afectado).

10 En algunas realizaciones, se une una molécula al extremo N-terminal de la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada (por ejemplo, de una proteína de fusión de ribotoxina), en donde la molécula puede escindir-se tras la captación de la molécula de sarcina modificada en una célula diana.

15 La molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada que tiene una permeabilidad de membrana reducida no se limita a las mutaciones R120Q, R120S, R121Q o R121S. Por ejemplo, los primeros 22 aminoácidos de α -sarcina, gigantina o clavina o los primeros 21 aminoácidos de restrictocina o mitogilina pueden ser importantes para la interacción de membrana (y el tráfico al sitio diana del bucle rico en sarcina de ARNr). En algunas realizaciones, uno o más de los primeros 21 o 22 aminoácidos de la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) se modifican para alterar la interacción de
20 membrana. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) comprende una supresión en los primeros 5 aminoácidos, una supresión en los primeros 10 aminoácidos, una supresión en los primeros 15 aminoácidos, una supresión en los primeros 20 aminoácidos, una supresión en los primeros 22 aminoácidos. En algunas realizaciones, pueden modificarse uno o más de los aminoácidos en la SEQ ID NO: 38, por ejemplo, suprimirse, sustituirse. Como alternativa, pueden
25 añadirse aminoácidos al extremo N-terminal (por ejemplo, un marcador, etc.) para ayudar a eliminar (o reducir) la permeabilidad de membrana.

30 La proteína de fusión de ribotoxina puede tener propiedades potenciadas (por ejemplo, retención celular potenciada) en comparación con la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) de tipo silvestre (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) sola, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada sola y/o la molécula de direccionamiento sola. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se modifica para potenciar su permeabilidad celular. En algunas realizaciones, la ribotoxina se modifica para reducir su permeabilidad celular (como se ha descrito anteriormente). En algunas realizaciones, la molécula de direccionamiento se modifica para
35 potenciar la permeabilidad celular y la ribotoxina se modifica para reducir su permeabilidad celular.

40 En algunas realizaciones, la proteína de fusión tiene mayor permeabilidad celular en comparación con la molécula de direccionamiento sola. En algunas realizaciones, la proteína de fusión tiene una mayor permeabilidad celular en comparación con la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada sola. En algunas realizaciones, la proteína de fusión se modifica para aumentar la permeabilidad celular en comparación con la ribotoxina de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína de fusión se modifica para aumentar la permeabilidad celular en comparación con la molécula de direccionamiento sola. En algunas realizaciones, la proteína de fusión se modifica para aumentar la permeabilidad celular en comparación con la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada sola. En
45 algunas realizaciones, la proteína de fusión tiene una retención celular aumentada en comparación con la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) de tipo silvestre.

50 En algunas realizaciones, la proteína de fusión tiene una retención celular aumentada en comparación con la molécula de direccionamiento sola. En algunas realizaciones, la proteína de fusión tiene una retención celular aumentada en comparación con la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada sola. En algunas realizaciones, la proteína de fusión se modifica para aumentar la retención celular en comparación con la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la proteína de fusión se modifica para aumentar la retención celular en comparación con la molécula de direccionamiento sola. En algunas realizaciones, la proteína de fusión se modifica para aumentar la retención celular en comparación con la molécula de ribotoxina por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada sola.
55

60 La proteína de fusión de ribotoxina puede comprender un medio (por ejemplo, un enlazador) para permitirle escapar de los endosomas. En algunas realizaciones, el enlazador se diseña para que se escinda en el citosol. En algunas realizaciones, el enlazador no puede escindir-se en la sangre, por ejemplo, suero.

EXPRESIÓN

65 La molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada y/o la proteína de fusión de ribotoxina pueden expresarse en cualquier sistema de expresión apropiado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina)

modificada y/o la proteína de fusión de ribotoxina se expresa en un sistema de expresión de *E. coli*. En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada y/o la proteína de fusión de ribotoxina se expresa en un sistema de expresión de *Pichia pastoris*.

5 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada comprende o está contenida en una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende o está contenida en una composición farmacéutica. Un experto en la materia conoce bien ejemplos de composiciones farmacéuticas para anticuerpos y péptidos y se describen a continuación.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada o la proteína de fusión se une a una molécula (o moléculas) que confiere una mayor estabilidad (por ejemplo, semivida en suero). Los dextranos, los diversos polietilenglicoles (PEG) y los péptidos de unión a albúmina son armazones extremadamente comunes para este propósito (véase, por ejemplo, Dennis et al., 2002, *Journal of Biological Chemistry* 33: 238390). Las moléculas pueden conjugarse con la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada o con la proteína de fusión mediante una diversidad de mecanismos, por ejemplo, a través de tratamientos químicos y/o modificación de la estructura de la proteína, la secuencia, etc. (véase, por ejemplo, Ashkenazi et al., 1997, *Current Opinions in Immunology* 9: 195-200; la Patente de los EE.UU. N.º 5.612.034; la Patente de los EE.UU. N.º 6.103.233). La molécula (por ejemplo, dextrano, PEG, etc.) puede unirse a la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada o la proteína de fusión a través de un sulfhidrilo reactivo mediante la incorporación de una cisteína en el extremo de la proteína opuesto a los bucles de unión. Dichas técnicas son bien conocidas en la técnica. En otro ejemplo, una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada o una proteína de fusión pueden unirse específicamente a la albúmina para utilizar la albúmina en el suero para aumentar la semivida circulante.

La elección de composiciones farmacéuticas que confieren el aumento de la estabilidad de la proteína o la unión de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada o la proteína de fusión para armazones que confieren una mayor estabilidad de la proteína no son las únicas formas en las que se puede mejorar la estabilidad de la proteína.

En algunas realizaciones, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada o la proteína de fusión de la presente divulgación pueden modificarse para alterar la estabilidad. El término "modificado" o "modificación" en este contexto puede incluir una o más mutaciones, adiciones, supresiones, sustituciones, adiciones de enlaces disulfuro, alteración física (por ejemplo, modificación de reticulación, unión covalente de un componente, modificación postraduccional, por ejemplo, acetilación, glucosilación, pegilación, similares o una combinación de los mismos), similares o una combinación de los mismos. Gong et al. (2009, *Journal of Biological Chemistry* 284: 14203-14210) muestra ejemplos de proteínas modificadas que tienen una mayor estabilidad.

Debido a la naturaleza inestable de las proteínas, las composiciones farmacéuticas con frecuencia se transportan y almacenan a través de cadenas de frío, que son cadenas de suministro ininterrumpidas de temperatura controlada. Por ejemplo, algunas composiciones farmacéuticas pueden almacenarse y transportarse a una temperatura entre aproximadamente 2 y 8 grados centígrados. Las cadenas de frío aumentan drásticamente los costes de dichas composiciones farmacéuticas. Sin pretender quedar ligados a ninguna teoría o mecanismo, se cree que aumentar la estabilidad de las moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas o las proteínas de fusión de la presente divulgación (por ejemplo, a través de composiciones farmacéuticas, etc.) puede ayudar a reducir o eliminar la necesidad de almacenar y transportar las moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas o las proteínas de fusión a través de cadenas de frío.

El vehículo farmacéutico (excipientes) puede ser un vehículo convencional pero no se limita a un vehículo convencional (excipiente). Por ejemplo, E. W. Martin, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª Edición (1975) y D. B. Troy, ed. *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore MD y Philadelphia, PA, 21ª Edición (2006) describen composiciones y formulaciones adecuadas para la entrega farmacéutica de uno o más moléculas o compuestos terapéuticos, tales como uno o más anticuerpos y agentes farmacéuticos adicionales. La Patente de los EE.UU. N.º 7.648.702 presenta una composición farmacéutica acuosa adecuada para el almacenamiento a largo plazo de polipéptidos que contienen un dominio Fc de una inmunoglobulina.

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender tampones (por ejemplo, fosfato de sodio, histidina, fosfato de potasio, citrato de sodio, citrato de potasio, ácido maleico, acetato de amonio, tris-(hidroximetil)-aminometano (tris), acetato, dietanolamina, etc.), aminoácidos (por ejemplo, arginina, cisteína, histidina, glicina, serina, lisina, alanina, ácido glutámico, prolina), cloruro de sodio, cloruro de potasio, citrato de sodio, sacarosa, glucosa, manitol, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, maltosa, inositol, trehalosa, seroalbúmina bovina (BSA), albúmina (por ejemplo, seroalbúmina

humana, albúmina recombinante), dextrano, PVA, hidroxipropil metilcelulosa (HPMC), polietilimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), polietilenglicol (PEG), etilenglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), clorhidrato, sacrosina, ácido gamma-aminobutírico, Tween-20, Tween-80, dodecilsulfato de sodio (SDS), polisorbato, copolímero de polioxietileno, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones de cinc, iones de cobre, iones de calcio, iones de manganeso, iones de magnesio, CHAPS, monolaurato de sacarosa, 2-O-beta-manoglicerato, similares o una combinación de los mismos. La presente invención no se limita de ninguna manera a los componentes de la composición farmacéutica que se desvelan en el presente documento, por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden comprender propulsores (por ejemplo, hidrofluoroalcano (HFA)) para la entrega de aerosol. La Patente de los EE.UU. N.º 5.192.743 describe una formulación que, cuando se reconstituye, forma un gel que puede mejorar la estabilidad de una proteína de interés (por ejemplo, para almacenamiento).

Las composiciones farmacéuticas pueden construirse apropiadamente para algunas o todas las vías de administración, por ejemplo, la administración tópica (incluyendo la inhalación y la administración nasal), la administración oral o enteral, la administración intravenosa o parenteral, la administración transdérmica, la administración epidural y/o similares. Por ejemplo, las formulaciones parenterales por lo general comprenden líquidos inyectables que incluyen fluidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos atóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que han de administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares atóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.

En algunas realizaciones, una formulación parenteral puede comprender fluidos inyectables incluyendo fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Como ejemplo no limitante, la formulación para trastuzumab inyectable incluye HCl de L-histidina, L-histidina, dihidrato de trehalosa y polisorbato 20 en forma de un polvo seco en un vial de vidrio que se reconstituye con agua estéril antes de la inyección. Se conocen bien en la técnica otras formulaciones de anticuerpos y proteínas para su uso parenteral o subcutáneo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos atóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que han de administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares atóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitano. Las composiciones farmacéuticas y las modificaciones de proteínas mencionadas anteriormente para aumentar la estabilidad de las proteínas pueden aplicarse como se describe en la Solicitud de Patente de los EE.UU. 2009/032692.

MÉTODOS PARA PRODUCIR MOLÉCULAS DE RIBOTOXINA MODIFICADAS Y PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Los métodos para producir moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas y proteínas de fusión que se describen en el presente documento son bien conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, las moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas pueden expresarse en un sistema bacteriano (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, *Escherichia coli*; Henze et al., *Eur J Biochem* 192: 127-131, 1990), un sistema de levadura, un sistema de presentación de fagos, un sistema de insecto, un sistema de mamífero, una presentación ribosómica, un sistema de presentación cis (Odegrip et al., 2004, *PNAS* 101, 2806-2810), similares, o una combinación de los mismos. La construcción de proteínas de fusión con sarcina en un sistema de expresión de *P. pastoris* se ha descrito en Carreras-Sangra et al., 2012, *PEDS* 25, 425-35. La presente divulgación no se limita a los métodos (por ejemplo, sistemas de expresión y presentación de proteínas) que se describen en el presente documento. Brevemente, como ejemplo, el método puede comprender obtener un vector que tenga una secuencia para una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada; producir un producto proteínico de la secuencia para la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada en un sistema de expresión; y al menos purificar parcialmente el producto proteínico.

La presente divulgación también presenta una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada que tiene inmunogenia reducida en comparación con la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) de tipo silvestre correspondiente producida a partir de los métodos que se describen en el presente documento (por ejemplo, véanse los Ejemplos a continuación). Como se ha analizado anteriormente, la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada opcionalmente tiene una solubilidad y una estabilidad potenciadas y/o una permeabilidad de la membrana reducida o una retención celular potenciada en comparación con la ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) de tipo silvestre correspondiente y puede producirse a partir de los métodos que se describen en el presente documento.

TRATAMIENTO O GESTIÓN DE ENFERMEDADES CON PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE RIBOTOXINA

5 Las moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restricción) modificadas de la presente divulgación pueden ser herramientas importantes para tratar o gestionar enfermedades o afecciones. La presente divulgación también proporciona métodos de tratamiento o gestión de una enfermedad o una afección (por ejemplo, en un mamífero, por ejemplo, un ser humano). Los métodos pueden comprender obtener una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada (o proteína de fusión que comprenda la misma) e introducir la molécula de ribotoxina modificada o proteína de fusión en un paciente, en donde la molécula de ribotoxina o la proteína de fusión se une a una diana y las funciones de unión provocan la neutralización o destrucción de la diana.

15 Opcionalmente, la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada (o proteína de fusión que comprende la misma) se une a una primera o segunda diana que provoca la activación o inhibición de un evento de señalización a través de esa diana. La molécula de ribotoxina modificada o proteína de fusión que comprende la misma puede comprender un agente (por ejemplo, químicas, péptido, toxina) que actúe para neutralizar o destruir la primera diana. En algunas realizaciones, el agente es inerte o tiene una actividad reducida cuando se construye como la molécula de ribotoxina modificada o proteína de fusión que comprende el mismo y el agente puede activarse o liberarse tras su captación o reciclaje.

20 La unión de la proteína de fusión de la molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada (o proteína de fusión que comprende la misma) puede actuar para provocar la neutralización o destrucción de la diana. La diana puede ser, por ejemplo, una célula, una célula tumoral, una célula inmunitaria, una proteína, un péptido, una molécula, una bacteria, un virus, un protista, un hongo, similares o una combinación de los mismos. La diana no se limita a los ejemplos mencionados anteriormente. Como ejemplo, la destrucción de una célula diana (en este ejemplo, un tumor) puede conseguirse mediante terapia usando la siguiente proteína de fusión: una molécula de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificada y una molécula de direccionamiento que comprende una molécula de dominio CH2 dirigida a un antígeno de superficie tumoral particular (tal como un EGFR, IGFR, nucleolina, ROR1, CD20, CD19, CD22, CD79a, marcadores de células madre).

35 En algunas realizaciones, la proteína de fusión puede unirse a un antígeno de superficie celular efector inmunitario (por ejemplo, un antígeno específico de linfocitos T como CD3 o un antígeno de superficie específico de linfocitos NK, como Fc γ RIIIa).

Pueden usarse diversos métodos para detectar la unión de la proteína de fusión (por ejemplo, molécula de direccionamiento) a la diana en la muestra. Dichos métodos son bien conocidos por un experto habitual en la materia.

40 SECUENCIAS Y CONSTRUCCIONES DE ADN

Aunque no se describen explícitamente, la presente divulgación también presenta secuencias de ADN aisladas y construcciones recombinantes para la producción de las moléculas de ribotoxina (por ejemplo, α -sarcina, clavina, gigantina, mitogilina o restrictocina) modificadas y proteínas de fusión que se describen en el presente documento. Las secuencias de ADN pueden optimizarse con codones para los diversos hospedadores de expresión.

EJEMPLO 1: CARTOGRAFIADO DE EPITOPOS DE LINFOCITOS T EN α -SARCINA

50 El siguiente ejemplo es un método que describe el cartografiado de epítomos de linfocitos T posibles en α -sarcina.

Se sometieron a ensayo péptidos solapados derivados de la secuencia de la toxina α -sarcina de 150 aminoácidos (y los péptidos para una mutación nula para permitir la expresión y ensayo de las variantes de toxina α -sarcina desinmunizadas principales) usando la tecnología de cartografiado de epítomos de linfocitos T EpiScreen™ (Antitope Ltd, Cambridge, Reino Unido). EpiScreen™ es una tecnología de análisis de linfocitos T *ex vivo* humana altamente precisa y sensible utilizada para determinar las respuestas de linfocitos T CD4+ auxiliares a proteínas completas, péptidos, formulaciones y NEQ (nuevas entidades químicas).

60 El protocolo de tecnología de cartografiado de epítomos de linfocitos T EpiScreen™ usa péptidos pentadecaméricos solapados por 12 aminoácidos. El uso de péptidos pentadecaméricos ayudará a identificar la ubicación de los epítomos de linfocitos T. Para el presente estudio, se usaron 46 péptidos pentadecaméricos. Además, se sometieron a ensayo dos conjuntos de 5 péptidos que abarcan mutantes nulos E96Q y H137Q.

65 Se sometió a ensayo la proliferación de los péptidos pentadecaméricos de α -sarcina contra 50 donadores de CMSP sanos que se seleccionaron para representar mejor la propagación de los alelos HLA-DR en la población. ¡Figura! Los linfocitos T CD8+ en las muestras de CMSP se agotaron para excluir la detección de respuestas de linfocitos T restringidas del CMH de clase I. Las CMSP de cada donador se descongelaron, se contaron y se evaluó su

viabilidad. Las células se revivieron en medio de cultivo AIM VR a temperatura ambiente (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) antes de ajustar la densidad celular a $2-3 \times 10^6$ CMSP/ml (solución madre de células de proliferación). Los péptidos se sintetizaron en una escala de 1-3 mg con amina N-terminal y ácido carboxílico C-terminal libres. Los péptidos se disolvieron en DMSO a una concentración de 10 mM y las soluciones madre de cultivo de péptidos se prepararon diluyendo en medio de cultivo AIM VR hasta una concentración final de 5 μ M en el pocillo. Para cada péptido y cada donador, se establecieron cultivos sextuplicados en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Tanto los cultivos de control positivo como negativo también se sometieron a ensayo por sextuplicado. Para cada donador, también se incluyeron tres controles (proteína KLH y péptidos derivados de VG y VEB). Para un control positivo, se usó PHA (Sigma, Dorset, Reino Unido) a una concentración final de 2,5 μ g/ml.

Los cultivos se incubaron durante un total de 6 días antes de añadir 0,75 μ Ci de 3 [H]-timidina (Perkin ElmerR, Beaconsfield, Reino Unido) a cada pocillo. Los cultivos se incubaron durante 18 horas adicionales antes de cosechar sobre esterillas de filtro usando un recolector de linfocitos TomTec Mach III. El rpm para cada pocillo se determinó mediante recuento por centelleo Meltilex™ (Perkin ElmerR, Beaconsfield, Reino Unido) en un Microplate Beta Counter (Perkin ElmerR, Beaconsfield, Reino Unido) en modo de recuento paralux, con fondo bajo.

Los datos se presentaron como no ajustados (todas las réplicas) y ajustados (retirando valores atípicos) y analizados usando parámetros de ensayo validados anteriormente. Los péptidos se consideraron positivos si el número de donadores que respondieron (índice de estimulación (IE) de $\geq 2,0$) fue superior a la respuesta promedio para el conjunto de datos completo más 2 X desviación típica (6,6 % en ambos conjuntos de datos), donde $IE = \text{rpm medio de pocillos de ensayo} / \text{rpm medio de pocillos de control}$. Los datos presentados de esta manera se indican como $IE \geq 2,00$, $p < 0,05$. Significación ($p < 0,05$) de la respuesta mediante comparación de los rpm de los pocillos de ensayo frente a los pocillos de control de medio usando un ensayo t de Student de dos muestras no apareadas.

Los resultados del cartografiado de epítomos de linfocitos T EpiScreen™ (Antitope Ltd, Cambridge, Reino Unido) de α -sarcina se muestran en la Figura 2. Se identificaron dos epítomos de linfocitos T, uno ubicado dentro de la región de 22 aminoácidos N-terminal implicado en la interacción de membrana y la unión de sarcina al ribosoma ("Epítomo de Sarcina 1") y abarcando el otro H137, que es parte de la tríada catalítica ("Epítomo de Sarcina 2"). Para el Epítomo de Sarcina 1, una alineación de los péptidos 2, 3 y 4, como se muestra a continuación, reveló un registro de unión al nonúmero núcleo de HLA-DQ previsto correspondiente a los aminoácidos 10-18 de α -sarcina (SEQ ID NO: 5).

Péptido 2: WTCLND**QKNPKTNKY** (SEQ ID NO: 37)
 Péptido 3: LND**QKNPKTNKY**ETK (SEQ ID NO: 38)
 Péptido 4: **QKNPKTNKY**ETKRLL (SEQ ID NO: 39)

Los péptidos 2 y 3 estimularon respuestas positivas de linfocitos T en los conjuntos de datos tanto ajustados como no ajustados. El péptido 4 no desencadenó una respuesta significativa de linfocitos T. Esto probablemente se debió a la falta de un resto P-1 en ese péptido (resto 9 de la α -sarcina de tipo silvestre), que admite la unión del péptido a HLA-DQ.

Para el Epítomo de Sarcina 2, una alineación de los péptidos 44, 45, 53 y 54 (los péptidos 53 y 54 derivaron del mutante nulo H137), como se muestra a continuación, reveló un segundo epítomo de linfocitos T, un registro de unión de nonúmero núcleo de HLA-DR previsto que corresponde a los aminoácidos 134-142 de α -sarcina de tipo silvestre (SEQ ID NO: 4).

Péptido 44: VFCG**IIAHTKENQGE** (SEQ ID NO: 40)
 Péptido 45: **GIIAHTKENQGE**LKL (SEQ ID NO: 41)
 Péptido 53: VFCG**IIAQTKENQGE** (SEQ ID NO: 42)
 Péptido 54: **GIIAQTKENQGE**LKL (SEQ ID NO: 43)

Los péptidos 44, 45, 53 y 54 estimularon respuestas de linfocitos T positivas en los conjuntos de datos tanto no ajustados como ajustados. Este epítomo abarca el resto catalítico H137 y los péptidos que contienen la mutación nula H137Q también son inmunógenos.

EJEMPLO 2 - DISEÑO DE VARIANTES DE EPÍTOMOS ÚNICOS DE SARCINA ALFA

El siguiente ejemplo describe el diseño de variantes de epítomos únicos de α -sarcina.

Se diseñaron variantes individuales de epítomos únicos de α -sarcina de manera que las regiones inmunógenas, identificadas mediante cartografiado de epítomos de linfocitos T, se modificaron para reducir o eliminar la inmunogenia de la proteína de α -sarcina de tipo silvestre conservando al mismo tiempo su función citotóxica. El diseño de dichas variantes se asistió mediante modelado informático de la estructura de la proteína α -sarcina. Se tuvieron en cuenta las restricciones en la modificación de la α -sarcina en determinadas ubicaciones y se diseñaron cambios de aminoácidos apropiados (teniendo en cuenta las estructuras proteínicas secundarias y terciarias, así como las posibles interacciones de las cadenas laterales de aminoácidos con el núcleo de la proteína) para la retirada de los epítomos de linfocitos T de la toxina α -sarcina. La selección de cambios de aminoácidos específicos

se vio influenciada por los datos biofísicos y bioquímicos disponibles, en particular donde se ubican los aminoácidos que pueden contribuir a las funciones conocidas o previstas de la toxina α -sarcina y también al plegamiento correcto de la α -sarcina.

5 Se generó una serie mutaciones de aminoácidos únicos tanto dentro como inmediatamente adyacentes a (P-1, el aminoácido directamente N-terminal al epítipo) los dos epítipos de linfocitos T identificados en el Ejemplo 1 (SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 4) y se evaluó la actividad tóxica en un ensayo de transcripción y traducción *in vitro* (TTIV).

10 Más específicamente, se generaron 29 variantes de epítipos únicos que tenían una mutación única como se muestra en la Figura 3 usando el plásmido de expresión de tipo silvestre de α -sarcina pRCT02-001 como molde y aplicando mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR. Las variantes de epítipos únicos se clonaron en el plásmido de expresión T7 pET22b (Novagen, N.º de Cat. 69744) corriente abajo del sitio Ndel. Como se demostró anteriormente que la mutación nula (H137Q) del plásmido de expresión (pRCT02-002) era inmunógena, también se incluyó una mutación nula no inmunógena alternativa (E96Q) usando mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR
15 (pRCT02-036). Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación.

Para evaluar la actividad tóxica de las variantes de epítipos únicos, se realizó un ensayo de TTIV sin células con un sistema de lisado de reticulocitos acoplados TnT® T7 (Promega, N.º de Cat. L4610). Brevemente, se sometieron a ensayo plásmidos pET22b que contenían α -sarcina de tipo silvestre (pRCT02-001), α -sarcina H137Q (pRCT02-002),
20 α -sarcina E96Q (pRCT02-036) o las 29 variantes de epítipos únicos que tenían una única mutación como se muestra en la Figura 3 a concentraciones que variaban de 200 ng a 3,125 ng por reacción de 12,5 μ l. El ADN de ensayo se combinó con la mezcla de reacción de TTIV y se incubó a 22 °C durante 45 min. Se añadieron 250 ng de plásmido de luciferasa T7 provisto con el sistema de lisado de reticulocitos acoplado TnT® T7 (Promega, N.º de Cat. L4610) y las reacciones se incubaron a 24 °C durante 90 min adicionales. La actividad de luciferasa se midió usando
25 el reactivo Steady Glo® (Promega, N.º de Cat. E2510) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se midió en un lector de placas FluoStar Optima (BMG Labtech). Se incluyeron plásmidos PRCT02-001 (control positivo) y pRCT02-002 (control negativo) en cada experimento. Los resultados se resumen en la Tabla 9.

30

TABLA 9

Plásmido	Cadena principal del vector	Mutación	Epítipo	CI50 relativa
pRCT02-007	pET22b	D9A	Epítipo 1	1,25
pRCT02-008	pET22b	D9T	Epítipo 1	0,92
pRCT02-009	pET22b	Q10K	Epítipo 1	0,87
pRCT02-010	pET22b	Q10R	Epítipo 1	1,23
pRCT02-011	pET22b	Q10A	Epítipo 1	0,53
pRCT02-012	pET22b	P13I	Epítipo 1	0,88
pRCT02-013	pET22b	T15G	Epítipo 1	0,62
pRCT02-014	pET22b	T15Q	Epítipo 1	1,11
pRCT02-015	pET22b	T15H	Epítipo 1	0,95
pRCT02-016	pET22b	N16R	Epítipo 1	0,86
pRCT02-017	pET22b	N16K	Epítipo 1	0,89
pRCT02-018	pET22b	N16A	Epítipo 1	0,54
pRCT02-019	pET22b	Y18H	Epítipo 1	0,86
pRCT02-020	pET22b	Y18K	Epítipo 1	0,67
pRCT02-021	pET22b	Y18R	Epítipo 1	0,82
pRCT02-022	pET22b	I134A	Epítipo 2	>10
pRCT02-023	pET22b	K139D	Epítipo 2	1,27
pRCT02-024	pET22b	K139E	Epítipo 2	0,88
pRCT02-025	pET22b	K139G	Epítipo 2	1,63
pRCT02-026	pET22b	K139Q	Epítipo 2	0,73
pRCT02-027	pET22b	K139H	Epítipo 2	0,71
pRCT02-028	pET22b	K139N	Epítipo 2	2,85
pRCT02-029	pET22b	E140D	Epítipo 2	0,65
pRCT02-030	pET22b	Q142D	Epítipo 2	1,54
pRCT02-031	pET22b	Q142N	Epítipo 2	0,96
pRCT02-032	pET22b	Q142T	Epítipo 2	0,66
pRCT02-033	pET22b	Q142E	Epítipo 2	1,04
pRCT02-034	pET22b	Q142R	Epítipo 2	0,91
pRCT02-035	pET22b	Q142G	Epítipo 2	0,53

Los datos indican que 28 de los 29 mutantes de epítipo único de α -sarcina (15/15 en el epítipo 1 y 13/14 en el epítipo 2) conservaron la capacidad de inhibir significativamente la traducción del gen de la luciferasa a un nivel similar a la α -sarcina de tipo silvestre (pRCT02-001) siendo la excepción I134A en el epítipo 2. La mayoría de las

variantes inhibieron la traducción del gen de la luciferasa a niveles similares a la α -sarcina de tipo silvestre (sujetos a variación de ensayo). Varias variantes inhibieron inesperadamente la traducción del gen de la luciferasa a niveles superiores a la α -sarcina de tipo silvestre. Los datos para 3 variantes de epítomos únicos (K139G, K139N y Q142D) sugirieron una inhibición reducida de la traducción (CI50 relativas >1,5). No se observó inhibición con RCT02-036, que codificaba la sarcina mutante nula E96Q.

EJEMPLO 3 - VARIANTES DE EPÍTOPOS MÚLTIPLES DE ALFA SARCINA

El siguiente ejemplo describe el diseño y la construcción de múltiples epítomos variantes de α -sarcina, que tenían una mutación en el Epítomo de Sarcina 1 y una mutación en el Epítomo de Sarcina 2.

Las variantes de epítomos dobles se generaron usando el plásmido de expresión de α -sarcina de tipo silvestre pRCT02-001 como molde y aplicando mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR que da como resultado los plásmidos que se detallan en la Tabla 10. Las variantes de epítomos únicos se clonaron en el plásmido de expresión T7 pET22b (Novagen, N.º de Cat. 69744) corriente abajo del sitio Ndel. Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

TABLA 10

Plásmido	Cadena principal del vector	Mutaciones	Epítomo	CI50 relativa
pRCT02-049	pET22b	Q10K K139D	Epítomo 1 y 2	1,16
pRCT02-050	pET22b	Q10K K139E	Epítomo 1 y 2	0,98
pRCT02-051	pET22b	Q10K Q142N	Epítomo 1 y 2	1,09
pRCT02-052	pET22b	N16R K139D	Epítomo 1 y 2	1,01
pRCT02-053	pET22b	N16R K139E	Epítomo 1 y 2	1,08
pRCT02-054	pET22b	N16R Q142N	Epítomo 1 y 2	1,11
pRCT02-055	pET22b	N16K K139D	Epítomo 1 y 2	1,62
pRCT02-056	pET22b	N16K K139E	Epítomo 1 y 2	1,79
pRCT02-057	pET22b	N16K Q142N	Epítomo 1 y 2	2,63
pRCT02-058	pET22b	Y18K K139D	Epítomo 1 y 2	1,36
pRCT02-059	pET22b	Y18K K139E	Epítomo 1 y 2	1,49
pRCT02-060	pET22b	Y18K Q142N	Epítomo 1 y 2	3,52
pRCT02-061	pET22b	Y18R K139D	Epítomo 1 y 2	1,05
pRCT02-062	pET22b	Y18R K139E	Epítomo 1 y 2	1,37
pRCT02-063	pET22b	Y18R Q142N	Epítomo 1 y 2	1,24
pRCT02-064	pET22b	Q10K Q142T	Epítomo 1 y 2	0,89
pRCT02-065	pET22b	N16R Q142T	Epítomo 1 y 2	1,28
pRCT02-066	pET22b	N16K Q142T	Epítomo 1 y 2	1,27
pRCT02-067	pET22b	Y18KQ142T	Epítomo 1 y 2	1,98
pRCT02-068	pET22b	Y18R Q142T	Epítomo 1 y 2	1,25

Para evaluar la actividad tóxica de las variantes de epítomos dobles, se realizó un ensayo de TIV sin células con un sistema de lisado de reticulocitos acoplados TnT® T7 (Promega, N.º de Cat. L4610) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, se sometieron a ensayo plásmidos pET22b que contenían α sarcina de tipo silvestre (pRCT02-001), α sarcina-H137Q (pRCT02-002) o variantes de epítomos dobles en concentraciones que variaban de 200 ng a 3,125 ng por reacción de 12,5 μ l. El ADN de ensayo se combinó con la mezcla de reacción de TIV y se incubó a 22 °C durante 45 min. Se añadieron 250 ng de ADN plasmídico de luciferasa T7 provisto del sistema de lisado de reticulocitos acoplados TnT® T7 (Promega, N.º de Cat. L4610) y las reacciones se incubaron a 24 °C durante 90 min adicionales. La actividad de luciferasa se midió usando el reactivo Steady Glo® (Promega, N.º de Cat. E2510) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se midió la luminiscencia en un lector de placas FluoStar Optima (BMG Labtech). Se incluyeron plásmidos pRCT02-001 (control positivo) y pRCT02-002 (control negativo) en cada experimento. Los valores relativos de CI50 se calcularon dividiendo la CI50 de α S-WT (pRCT02-001) por la de la variante de epítomo doble sometida a ensayo en la misma placa. Los resultados se resumen en la Tabla 9 anterior. Los datos indicaron que 18 de las 20 variantes de epítomos dobles conservaron la capacidad de inhibir la traducción del gen de la luciferasa a un nivel dentro de 2 veces la α -sarcina de tipo silvestre (pRCT02-001).

Se seleccionaron ocho variantes de epítomos dobles como se muestra en la Tabla 11 para la producción de proteínas y el análisis posterior. Estos se basaron parcialmente en los datos de actividad (como se resume en la Tabla 10) y en otros criterios, por ejemplo, la exclusión de Q142N basándose en su asociación con una serie de variantes menos activas. Se clonaron genes que codificaban las ocho variantes de epítomos dobles seleccionadas en el plásmido de expresión T7 pET22b (Novagen) corriente abajo de un péptido líder OMPA modificado (proteína de membrana externa A), que se ha demostrado que tienen un procesamiento y una exportación mejorados en comparación con la secuencia original (Lacadena J., *et al.* 1994) para crear los vectores de expresión que se detallan en la Tabla 11. Además, un marcador 6x His (SEQ ID NO: 50) se fusionó genéticamente al extremo C-terminal de las proteínas para permitir la detección usando anticuerpos anti-His, así como para su uso en la

purificación de proteínas.

TABLA 11

Nombre del plásmido de TTIV	Nombre del plásmido de expresión	Mutaciones
pRCT02-049	pRCT02-069	Q10K K139D
pRCT02-050	pRCT02-070	Q10K K139E
pRCT02-052	pRCT02-071	N16R K139D
pRCT02-053	pRCT02-072	N16R K139E
pRCT02-058	pRCT02-073	Y18K K139D
pRCT02-059	pRCT02-074	Y18K K139E
pRCT02-062	pRCT02-075	Y18R K139E
pRCT02-064	pRCT02-076	Q10K Q142T

- 5 Para expresar las variantes de epítomos dobles, se usó un derivado de *E. coli* BL21 cepa SHuffle™ T7 Express (NEB, N.º de Cat. C3029H) que sobreexpresaba las chaperoninas GroEL/S. Las bacterias se transformaron con plásmidos de expresión que codificaban variantes de epítomos dobles junto con α -sarcina de tipo silvestre y el mutante nulo (α -sarcina H137Q) y se sembraron. Se recogieron colonias individuales y se cultivaron en caldo 2YT durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, el cultivo nocturno se diluyó 1:20 en caldo 2YT y se controló el crecimiento bacteriano a 37 °C mediante medición de DO600. La expresión de proteínas se indujo a DO600 nm = 1,0 mediante la adición de IPTG para proporcionar una concentración final de 1 mM y después el cultivo se cultivó a 20 °C durante la noche antes de que las células se recogieran mediante centrifugación. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 10 ml de reactivo B-PER por cultivo de 50 ml (Pierce, N.º de Cat. 78248) que contenían Dnasa I (Roche, N.º de Cat. 04716728001) con inhibidores de proteasa (Roche, N.º de Cat. 04693159001). La proteína insoluble se retiró mediante centrifugación de acuerdo con el protocolo del fabricante y la proteína soluble se cuantificó usando un ensayo de proteína Bio-Rad (N.º de Cat. 500-0006). Los geles de proteína se sometieron a transferencia Western y se detectaron las proteínas expresadas usando un anticuerpo anti-His (Sigma, N.º de Cat. A7058). La transferencia western mostró que una proporción significativa de la proteína expresada de las variantes de epítomos dobles era soluble. Figura 4. La excepción fue la variante Y18K Y139D (pRCT02-058) que mostró una fracción insoluble significativa con solo una fracción soluble menor. Figura 4.

Para evaluar la actividad, el material soluble se sometió a ensayo en el ensayo de TTIV, como se ha analizado anteriormente. Se realizaron diluciones en serie de 4 veces comenzando con 1 ng de extracto de proteína soluble en el primer pocillo seguidas de una preincubación con el reactivo de TTIV a 30 °C durante 15 min antes de que se añadieran 250 ng de plásmido T7 Luciferasa a cada reacción. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 90 min y se midió la actividad luciferasa usando el reactivo Steady Glo® (Promega, N.º de Cat. E2510) como se ha descrito anteriormente. Muchos de los mutantes dobles mostraron niveles de expresión potenciados en comparación con la α sarcina de tipo silvestre, produciéndose cantidades significativamente mayores de material soluble. El material soluble en los extractos en bruto de la variante de epítomo doble fue significativamente más activo en el ensayo de TTIV en comparación con la α sarcina H137Q, lo que sugiere que la proteína está plegada correctamente. Figura 5. Se asoció determinada actividad de fondo al extracto soluble de α sarcina H137Q; sin embargo, esto puede atribuirse al hecho de que la proteína α -sarcina H137Q no se purificó y, por tanto, contenía otras proteínas hospedadoras bacterianas.

- 35 En resumen, se generaron genes que codificaban 20 variantes de epítomos dobles de α -sarcina, se clonaron y se sometieron a ensayo en el ensayo de TTIV. De estas, 18 variantes conservaron la actividad en el ensayo de TTIV dentro de dos veces la de la α sarcina de tipo silvestre. La expresión y actividad de 8 variantes de epítomos dobles seleccionadas se analizaron adicionalmente después de la clonación en un vector de expresión. La expresión de la proteína soluble mejoró para todas las variantes, excepto Y18K Y139D (pRCT02-058), en comparación con la α sarcina de tipo silvestre y la proteína soluble de cada una de estas variantes se extrajo y se demostró que era activa en el ensayo de TTIV.

EJEMPLO 4 - VARIANTES TRIPLES Y CUÁDRUPLES DE ALFA SARCINA

- 45 El siguiente ejemplo describe el diseño y la construcción de 1) variantes triples de α -sarcina, que tenían dos mutaciones en Epítomo de Sarcina 1 y una mutación en Epítomo de Sarcina 2 o una mutación en Epítomo de Sarcina 1 y dos mutaciones en Epítomo de Sarcina 2; y 2) variantes cuádruples de α -sarcina, que tenían dos mutaciones en Epítomo de Sarcina 1 y dos mutaciones en Epítomo de Sarcina 2.
- 50 Se generaron siete variantes triples y dos cuádruples usando el plásmido de expresión de α -sarcin-TS pRCT02-001 como molde y aplicando la mutagénesis dirigida al sitio basada en PCR dando como resultado plásmidos que se detallan en la Tabla 12. Las variantes de epítomos se clonaron en el plásmido de expresión T7 pET22b (Novagen, N.º de Cat. N.º de Cat. 69744) corriente abajo del sitio Ndel. Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN.

TABLA 12

Plásmido	Cadena principal del vector	Mutaciones	Epítopo	CI50 relativa
pRCT02-081	pET22b	Q10K K139D Q142T	Epítopo 1 Epítopo 2	0,32
pRCT02-082	pET22b	Q10K K139E Q142T	Epítopo 1 Epítopo 2	0,22
pRCT02-083	pET22b	N16R K139D Q142T	Epítopo 1 Epítopo 2	0,27
pRCT02-084	pET22b	N16R K139E Q142T	Epítopo 1 Epítopo 2	0,22
pRCT02-085	pET22b	Q10K N16R K139D	Epítopo 1 Epítopo 2	
pRCT02-086	pET22b	Q10K 16R K139E	Epítopo 1 Epítopo 2	
pRCT02-087	pET22b	Q10K N16R Q142T	Epítopo 1 Epítopo 2	
pRCT02-088	pET22b	Q10K N16R K139D Q142T	Epítopo 1 Epítopo 2	
pRCT02-089	pET22b	Q10K N16R K139E Q142T	Epítopo 1 Epítopo 2	

La actividad tóxica de las variantes triples y cuádruples se evaluó como se describe en el Ejemplo 3. Los resultados se muestran en la Figura 6 y se resumen en la Tabla 12 anterior. Los datos indicaron que 4 de las 9 variantes triples y cuádruples de α -sarcina conservaron la capacidad de inhibir la traducción del gen de la luciferasa (pRCT02-001).

5

Se seleccionaron cuatro variantes triples como se muestra en la Tabla 13 basándose en los datos de actividad (como se resumen en la Tabla 12) para la producción de proteínas y análisis adicionales. Los genes que codifican las cuatro variantes triples seleccionadas se clonaron en el plásmido de expresión T7 pET22b (Novagen) corriente abajo de un péptido líder OMPA (proteína de membrana externa A) modificado, que se ha demostrado que tienen un procesamiento y una exportación mejorados en comparación con la secuencia original (Lacadena J., *et al.* 1994) para crear los vectores de expresión que se detallan en la Tabla 13. Además, un marcador 6x His (SEQ ID NO: 50) se fusionó genéticamente al extremo C-terminal de las proteínas para permitir la detección usando anticuerpos anti-His, así como para ayudar en la purificación de proteínas.

10
15

TABLA 13

Nombre del plásmido de TTIV	Nombre del plásmido de expresión	Mutaciones
pRCT02-081	pRCT02-090	Q10K K139D Q142T
pRCT02-082	pRCT02-091	Q10K K139E Q142T
pRCT02-083	pRCT02-092	N16R K139D Q142T
pRCT02-084	pRCT02-093	N16R K139E Q142T

Las variantes triples de α -sarcina se expresaron como en el Ejemplo 3. Los geles de proteína se sometieron a transferencia Western y se detectaron las proteínas expresadas usando un anticuerpo anti-His (Sigma, N.º de Cat. A7058) como se muestra en la Figura 7A. La Figura 7A muestra que una proporción significativa de la proteína expresada para las variantes triples era soluble. La cantidad de material soluble producido por todas las variantes triples fue comparable a la de la α -sarcina-TS. La expresión de proteínas de pRCT02-092 y pRCT02-093 parecía ser superior a la de pRCT02-090 y pRCT02-091.

20

Para purificar de forma discontinua las variantes triples de α -sarcina, se usó un derivado de *E. coli* BL21 cepa SHuffle™ T7 Express (NEB, N.º de Cat. C3029H) que sobreexpresaba las chaperoninas GroEL/S. Las bacterias se transformaron con plásmidos de expresión que codificaban variantes triples junto con α -sarcina-TS y el mutante nulo (α S-H137Q) y estos se sembraron. Se recogieron colonias individuales y se cultivaron en caldo 2YT durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, los cultivos durante la noche se diluyeron 1:20 en 500 ml de caldo 2YT y se controló el crecimiento bacteriano a 37 °C mediante medición de DO600. La expresión de proteínas se indujo a DO600 nm = 1,0 mediante la adición de IPTG para proporcionar una concentración final de 1 mM y los cultivos se cultivaron a 20 °C durante la noche antes de que las células se cosecharan mediante centrifugación y se congelaran durante la noche a -80 °C. Los sedimentos celulares se resuspendieron en B-PER (Pierce, N.º de Cat. 78248) que contenían Dnasa I (Roche, N.º de Cat. 04716728001) con inhibidores de proteasa (Roche, N.º de Cat. 04693159001). La proteína insoluble se retiró mediante centrifugación de acuerdo con el protocolo del fabricante. La proteína soluble se diluyó 2 veces en Tris 40 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazol 80 mM y se retiró mediante centrifugación antes de la adición de 1 ml de Ni-NTA-agarosa (Qiagen, N.º de Cat. 1018244) preequilibrada con Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM e imidazol 40 mM (tampón de unión) e incubación con rotación durante la noche a 4 °C. La proteína no unida se retiró mediante centrifugación seguida de un lavado de 10 VC con tampón de unión. Después se realizó una elución escalonada comenzando con un lavado de 10 VC con Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazol 100 mM (tampón de lavado) seguido de elución con Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM, imidazol 400 mM (tampón de

25

30

35

40

elución). Se recogieron fracciones de 1 ml de la elución y se desarrollaron en geles de proteínas. Las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon, se intercambiaron el tampón en PBS a pH 7,4 y se cuantificó la proteína soluble usando un ensayo de proteína Bio-Rad (N.º de Cat. 500-0006). Todas las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE reductora. Se cargó 1 µg de cada muestra en un gel NuPage 4-12 % Bis-Tris (Invitrogen N.º de Cat. NP0322BOX) y se desarrolló a 200 V durante 35 min. Figura 7B.

Para evaluar la actividad de las variantes triples purificadas, se realizó un ensayo de TTIV como se ha descrito anteriormente con algunas modificaciones. En resumen, se preincubaron 5 ng de proteína purificada y diluciones de 10 veces de la misma, con ribosomas a 30 °C durante 15 min antes de que se añadieran 250 ng de plásmido T7 Luciferasa a cada reacción. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 90 min y se midió la actividad luciferasa usando el reactivo Steady Glo® como se ha descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 8, todas las variantes conservaron una actividad comparable a la de la α-sarcina de tipo silvestre.

La actividad citotóxica de las proteínas purificadas se midió en un ensayo de citotoxicidad celular usando la estirpe celular linfoblastoide T Jurkat como diana. Brevemente, se diluyeron células Jurkat en la fase logarítmica del crecimiento a 1,25x10⁵ células/ml y se dispensaron 50 µl en cada pocillo de una placa de cultivo de tejido de paredes blancas de 96 pocillos (Corning N.º de Cat. 3610). Se preparó una placa de dilución que contenía una serie de diluciones con factor de dilución 5 de siete puntos de cada muestra de ensayo y se transfirieron 50 µl de cada serie de dilución directamente a las células Jurkat. Después, la placa de células Jurkat se devolvió a la incubadora durante 72 horas adicionales. Después de la incubación, la placa se equilibró a temperatura ambiente durante 10 min. La placa se desarrolló mediante la adición de 100 µl de reactivo Cell TiterGlo® (Promega, N.º de Cat. G7571) a cada pocillo y se tomaron lecturas de luminiscencia de 1 segundo usando un lector de placa FluoStar Optima (BMG Labtech).

Usando variantes triples purificadas, se observó la destrucción eficaz de las células Jurkat con todas las variantes (Figura 9), lo que indica que las proteínas se translocan a través de la membrana celular e inhiben la síntesis de proteínas de manera similar a la α-sarcina-TS.

En resumen, se generaron y sometieron a ensayo 7 variantes triples y 2 variantes cuádruples en el ensayo de TTIV. Estos datos mostraron que 4 de las variantes triples conservaron la capacidad de inhibir la traducción del gen indicador de luciferasa. Cada una de estas variantes contenía una mutación en el epítipo 1 y dos mutaciones en el epítipo 2. Se demostró que todas las variantes que contenían dos mutaciones en el epítipo 1 y una mutación en el epítipo 2, así como las variantes cuádruples, que contenían dos mutaciones en cada epítipo, tenían actividad alterada en el ensayo de TTIV. Las cuatro variantes triples que conservaron la actividad se analizaron adicionalmente para evaluar la expresión y la actividad. Niveles significativos de proteína de estas variantes triples fueron solubles y se demostró que la proteína purificada era activa en el ensayo de TTIV, así como en un ensayo de citotoxicidad celular.

EJEMPLO 5 - ENSAYOS DE INMUNOGENIA DE VARIANTES DE EPÍTOPOS DE A-SARCINA

El siguiente ejemplo describe el ensayo de inmunogenia de variantes de epítopos optimizadas usando ensayos de linfocitos T de curso de tiempo de proteína completa EpiScreen™.

Para una evaluación de la inmunogenia, las variantes de epítipo de toxina α-sarcina optimizadas principal y de respaldo identificadas (véase anteriormente) se expresarán (como mutantes nulos), se purificarán y se compararán con la toxina α-sarcina purificada de tipo silvestre (mutante nulo) en ensayos de linfocitos T de curso de tiempo de proteína completa EpiScreen™ con el fin de confirmar un riesgo reducido de inmunogenia.

Se establecerán cultivos a granel de CMSP empobrecidas en linfocitos T CD8+ de donadores sanos seleccionados en presencia de las toxinas de α-sarcina de tipo silvestre y de variantes optimizadas. Las alícuotas de los blastos T se retirarán de los cultivos en volumen en los días 5 a 8 con una evaluación de la activación de linfocitos T mediante proliferación (captación de 3H-timidina) y secreción de citocinas IL-2 (ensayos ELISpot).

Se usarán capas leucocíticas de 20 donadores sanos con HLA tipado para aislar las CMSP que contengan niveles fisiológicos de APC y linfocitos T CD4+. Los linfocitos T CD8+ se agotarán para excluir la detección de respuestas de linfocitos T restringidas de CMH clase I; Cada donador se someterá a ensayo frente a antígenos de control de reproducibilidad, incluyendo la hemocianina de lapa californiana (un potente neoantígeno) o el toxoide tetánico (antígeno de recuerdo); después, la activación de linfocitos T específicos de toxina α-sarcina se determinará mediante proliferación (captación de 3H-timidina) y secreción de IL-2 (ELISpot); Los datos se analizarán usando parámetros de ensayo validados anteriormente por los que respuestas de un índice de estimulación (IE) de >2,0 se puntúan como positivas, respaldados por información adicional incluyendo análisis estadísticos y de frecuencia; Los datos para las variantes de α-sarcina optimizadas se compararán con la toxina α-sarcina de tipo silvestre. Esto proporcionará una evaluación del riesgo relativo de inmunogenia para las variantes de α-sarcina optimizadas en comparación con las de tipo silvestre; Los datos de inmunogenia para las variantes de α-sarcina optimizadas también se compararán con los datos de referencia de EpiScreen™ para una gama de anticuerpos y proteínas en etapa clínica con inmunogenia conocida. Esto proporcionará una evaluación del riesgo de inmunogenia clínica para

las variantes de α -sarcina optimizadas principal y de respaldo. Se realizará una evaluación de cualquier asociación entre el alotipo de CMH de clase II donador y las respuestas de los linfocitos T a las variantes de α -sarcina optimizadas principal y de respaldo.

- 5 Diversas modificaciones de la invención, además de las que se describen en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior.

Aunque se ha mostrado y descrito la realización preferida de la presente invención, será evidente para los expertos en la materia que pueden hacerse modificaciones a la misma.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> RESEARCH CORPORATION TECHNOLOGIES, INC.

- 15 <120> MOLECULAS DE RIBOTOXINA DERIVADAS DE SARCINA Y OTRAS RIBOTOXINAS FÚNGICAS RELACIONADAS

<130> 0185.0001-PCT

- 20 <140>
<141>

<150> 61/783.589
<151> 14/03/2013

- 25 <150> 61/902.972
<151> 12/11/2013

<160> 58

- 30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 150
<212> PRT
<213> *Aspergillus sp.*

- 35 <400> 1

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn
1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

ES 2 765 302 T3

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
 85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
 100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
 115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
 130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
 145 150

5 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*
 <400> 2

10 Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
 1 5

15 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*
 <400> 3

20 Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn Lys Val
 1 5

25 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*
 <400> 4

30 Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln
 1 5

35 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

<400> 5

Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn Lys Tyr
 1 5

<210> 6

ES 2 765 302 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

5 <400> 6

Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn Lys Tyr
1 5 10

10 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp, Ala o Thr

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Gln, Lys, Arg o Ala

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Pro o Ile

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Thr, Gly, Gln o His

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Asn, Arg, Lys o Ala

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Tyr, His, Lys o Arg

<400> 7

Xaa Xaa Lys Asn Xaa Lys Xaa Xaa Lys Xaa
1 5 10

50 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

60 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)
 <223> Gln, Lys, Arg o Ala

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Lys o Leu

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Pro o Ile

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Thr, Gly, Gln o His

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Asn, Arg, Lys o Ala

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Tyr, His, Lys, Arg o Trp

30 <400> 8

Xaa Xaa Asn Xaa Lys Xaa Xaa Lys Xaa
1 5

35 <210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Asp, Ala o Thr

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Gln, Lys, Arg o Ala

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Lys o Leu

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Pro o Ile

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)

ES 2 765 302 T3

<223> Thr, Gly, Gln o His

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Asn, Arg, Lys o Ala

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Tyr, His, Lys, Arg o Trp

10

<400> 9

Xaa Xaa Xaa Asn Xaa Lys Xaa Xaa Lys Xaa
 1 5 10

15

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ile o Ala

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Lys, Asp, Glu, Gly, Gln, His o Asn

35

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Glu o Asp

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Gln, Asp, Asn, Thr, Glu, Arg o Gly

45

<400> 10

Xaa Ile Ala His Thr Xaa Xaa Asn Xaa
 1 5

50

<210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ile o Ala

60

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ile o Val
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Thr o Gln
 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Lys, Asp, Glu, Gly, Gln, His o Asn
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Glu o Asp
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Gln, Asp, Asn, Thr, Glu, Arg o Gly
 25 <400> 11

Xaa Xaa Ala His Xaa Xaa Xaa Asn Xaa
1 5

30 <210> 12
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Asp
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Gln
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Pro
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Thr
 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Asn
 <220>
 <221> MOD_RES

ES 2 765 302 T3

<222> (18)..(18)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Tyr

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (134)..(134)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Ile

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (139)..(139)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Lys

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (140)..(140)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Glu

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (142)..(142)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Gln

25 <400> 12

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

ES 2 765 302 T3

5 <210> 13
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Asp, Ala o Thr

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Gln, Lys, Arg o Ala

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Pro o Ile

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Thr, Gly, Gln o His

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Asn, Arg, Lys o Ala

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Tyr, His, Lys o Arg

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (134)..(134)
 <223> Ile o Ala

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (139)..(139)
 <223> Lys, Asp, Glu, Gly, Gln, His o Asn

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (140)..(140)
 <223> Glu o Asp

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (142)..(142)
 <223> Gln, Asp, Asn, Thr, Glu, Arg o Gly

60 <400> 13

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Xaa Xaa Lys Asn Xaa Lys Xaa Xaa
 1 5 10 15

ES 2 765 302 T3

Lys Xaa Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
 20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
 35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
 50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
 65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
 85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
 100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
 115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Xaa Ile Ala His Thr Xaa Xaa Asn Xaa Gly Glu
 130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
 145 150

<210> 14
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Lys o Ala

<400> 14

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Xaa Lys Asn Pro Lys Thr Asn
 1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
 20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
 35 40 45

ES 2 765 302 T3

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
145 150

<210> 15

<211> 150

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> Arg, Lys o Ala

<400> 15

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Xaa
1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

5

10

15

ES 2 765 302 T3

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
145 150

<210> 16

<211> 150

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (18)..(18)

<223> Lys o Arg

<400> 16

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn
1 5 10 15

Lys Xaa Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys

5

10

15

ES 2 765 302 T3

```

                100                105                110
Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
   115                120                125
Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
   130                135                140
Leu Lys Leu Cys Ser His
   145                150

```

```

5 <210> 17
   <211> 150
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial
10 <220>
   <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
15 <220>
   <221> MOD_RES
   <222> (139)..(139)
   <223> Asp o Glu
   <400> 17

```

```

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

```

ES 2 765 302 T3

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Xaa Glu Asn Gln Gly Glu
 130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
 145 150

- <210> 18
- <211> 150
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
- <400> 18

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn
 1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
 20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
 35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
 50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
 65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
 85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
 100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
 115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Asp Asn Gln Gly Glu
 130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
 145 150

- 15 <210> 19
- <211> 150
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>

ES 2 765 302 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (142)..(142)

<223> Asn, Thr o Glu

<400> 19

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn
1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Xaa Gly Glu
130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
145 150

10

<210> 20

<211> 150

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

20

<220>

<221> MOD_RES

<222> (139)..(139)

<223> Asp o Glu

25

<400> 20

ES 2 765 302 T3

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Lys Lys Asn Pro Lys Thr Asn
1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Xaa Glu Asn Gln Gly Glu
130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
145 150

5 <210> 21
<211> 150
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (139)..(139)
15 <223> Asp o Glu

<400> 21

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Arg
1 5 10 15

ES 2 765 302 T3

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Xaa Glu Asn Gln Gly Glu
130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
145 150

<210> 22
<211> 150
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<220>
15 <221> MOD_RES
<222> (18)..(18)
<223> Lys o Arg

<220>
20 <221> MOD_RES
<222> (139)..(139)
<223> Asp o Glu

<400> 22

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn
1 5 10 15

Lys Xaa Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser

ES 2 765 302 T3

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Thr Gly Glu
130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
145 150

<210> 24
<211> 150
<212> PRT
<213> *Aspergillus sp.*

5

<400> 24

Ala Ala Thr Trp Thr Cys Met Asn Glu Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn
1 5 10 15

Lys Tyr Glu Asn Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Asn Ala Glu Ser
20 25 30

Asn Ala His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Ile Leu Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Trp Gly Asn Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asn Gly Asp Gly Lys Asn Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Gln Tyr Asn Phe Asp Ser Lys Lys
100 105 110

Pro Lys Glu Asp Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
115 120 125

10

ES 2 765 302 T3

Lys Val Phe Cys Gly Ile Val Ala His Thr Arg Glu Asn Gln Gly Asp
 130 135 140
 Leu Lys Leu Cys Ser His
 145 150

5
 <210> 25
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*
 <400> 25

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

10
 <210> 26
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*
 <400> 26

ES 2 765 302 T3

Ala Thr Trp Thr Cys Ile Asn Gln Gln Leu Asn Pro Lys Thr Asn Lys
 1 5 10 15

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

Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr Pro
 35 40 45

His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asn Gly Lys Leu Ile Lys Gly
 50 55 60

Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ala Asp Cys Asp Arg Pro Pro Lys
 65 70 75 80

His Ser Gln Asn Gly Met Gly Lys Asp Asp His Tyr Leu Leu Glu Phe
 85 90 95

Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys Pro
 100 105 110

Lys Glu Asp Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn Lys
 115 120 125

Val Phe Cys Gly Ile Val Ala His Gln Arg Gly Asn Gln Gly Asp Leu
 130 135 140

Arg Leu Cys Ser His
 145

5 <210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

10 <400> 27

Ile Val Ala His Thr Arg Glu Asn Gln
 1 5

15 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

20 <400> 28

Leu Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Trp
 1 5

ES 2 765 302 T3

5 <210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> *Aspergillus sp.*

<400> 29

Val Phe Cys Gly Ile Val Ala His Thr
1 5

10 <210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> *Aspergillus sp.*

15 <400> 30

Leu Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe
1 5

20 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> *Aspergillus sp.*

25 <400> 31

Gln Lys Asn Ile Lys Thr Asn Lys Tyr
1 5

30 <210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> *Aspergillus sp.*

<400> 32

Ile Ile Ala His Thr Arg Glu Asn Gln
1 5

40 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> *Aspergillus sp.*

<400> 33

Ile Lys Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe
1 5

45 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> *Aspergillus sp.*

50 <400> 34

Val Phe Cys Gly Ile Val Ala His Gln
1 5

ES 2 765 302 T3

5 <210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

<400> 35

Ile Val Ala His Gln Arg Gly Asn Gln
 1 5

10 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

15 <400> 36

Gln Leu Asn Pro Lys Thr Asn Lys Trp
 1 5

20 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

25 <400> 37

Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn Lys Tyr
 1 5 10 15

30 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

35 <400> 38

Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn Lys Tyr Glu Thr Lys
 1 5 10 15

40 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

<400> 39

45 Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu
 1 5 10 15

50 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

<400> 40

ES 2 765 302 T3

```

Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
1           5           10           15

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> Aspergillus sp.

<400> 41

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

<210> 42
<211> 15
<212> PRT
<213> Aspergillus sp.

<400> 42

Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala Gln Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
1           5           10           15

<210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Aspergillus sp.

<400> 43

Gly Ile Ile Ala Gln Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu Leu Lys Leu
1           5           10           15

<210> 44
<211> 10
<212> PRT
<213> Aspergillus sp.

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(2)
<223> Esta región puede abarcar "Gln" o "Asp-Gln" en donde algunas posiciones pueden estar ausentes

40 <400> 44

Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn Lys Tyr
1           5           10

<210> 45
<211> 149
<212> PRT
<213> Aspergillus sp.

<400> 45

```

ES 2 765 302 T3

Ala Thr Trp Thr Cys Ile Asn Gln Gln Leu Asn Pro Lys Thr Asn Lys
1 5 10 15

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

Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr Pro
35 40 45

His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asn Gly Lys Leu Ile Lys Gly
50 55 60

Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ala Asp Cys Asp Arg Pro Pro Lys
65 70 75 80

His Ser Gln Asn Gly Met Gly Lys Asp Asp His Tyr Leu Leu Glu Phe
85 90 95

Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys Pro
100 105 110

Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn Lys
115 120 125

Val Phe Cys Gly Ile Val Ala His Gln Arg Gly Asn Gln Gly Asp Leu
130 135 140

Arg Leu Cys Ser His
145

<210> 46

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 46

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Lys Lys Asn Pro Lys Thr Asn
1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
20 25 30

ES 2 765 302 T3

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
 35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
 50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
 65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
 85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
 100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
 115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu
 130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
 145 150

<210> 47

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 47

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Lys Lys Asn Pro Lys Thr Asn
 1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
 20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
 35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
 50 55 60

ES 2 765 302 T3

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Glu Glu Asn Thr Gly Glu
130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
145 150

<210> 48

<211> 150

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 48

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Arg

1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
85 90 95

5

10

ES 2 765 302 T3

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
 100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
 115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Asp Glu Asn Thr Gly Glu
 130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
 145 150

<210> 49

<211> 150

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 49

Ala Val Thr Trp Thr Cys Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Arg
 1 5 10 15

Lys Tyr Glu Thr Lys Arg Leu Leu Tyr Asn Gln Asn Lys Ala Glu Ser
 20 25 30

Asn Ser His His Ala Pro Leu Ser Asp Gly Lys Thr Gly Ser Ser Tyr
 35 40 45

Pro His Trp Phe Thr Asn Gly Tyr Asp Gly Asp Gly Lys Leu Pro Lys
 50 55 60

Gly Arg Thr Pro Ile Lys Phe Gly Lys Ser Asp Cys Asp Arg Pro Pro
 65 70 75 80

Lys His Ser Lys Asp Gly Asn Gly Lys Thr Asp His Tyr Leu Leu Glu
 85 90 95

Phe Pro Thr Phe Pro Asp Gly His Asp Tyr Lys Phe Asp Ser Lys Lys
 100 105 110

Pro Lys Glu Asn Pro Gly Pro Ala Arg Val Ile Tyr Thr Tyr Pro Asn
 115 120 125

Lys Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Glu Glu Asn Thr Gly Glu
 130 135 140

Leu Lys Leu Cys Ser His
 145 150

ES 2 765 302 T3

Trp Thr Cys Leu Asn Xaa Xaa Lys Asn Xaa Lys Xaa Xaa Lys Xaa
 1 5 10 15

5 <210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

<400> 53

Leu Asn Asp Gln Lys Asn Pro Lys Thr Asn Lys Tyr Glu Thr Lys
 1 5 10 15

10 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Asp, Ala o Thr

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Gln, Lys, Arg o Ala

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Pro o Ile

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9) .. (9)
 <223> Thr, Gly, Gln o His

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Asn, Arg, Lys o Ala

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12) .. (12)
 <223> Tyr, His, Lys o Arg

50 <400> 54

Leu Asn Xaa Xaa Lys Asn Xaa Lys Xaa Xaa Lys Xaa Glu Thr Lys
 1 5 10 15

55 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

<400> 55

60

ES 2 765 302 T3

Val Phe Cys Gly Ile Ile Ala His Thr Lys Glu Asn Gln Gly Glu
 1 5 10 15

5 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Ile o Ala

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Lys, Asp, Glu, Gly, Gln, His o Asn

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Glu o Asp

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Gln, Asp, Asn, Thr, Glu, Arg o Gly

30 <400> 56

Val Phe Cys Gly Xaa Ile Ala His Thr Xaa Xaa Asn Xaa Gly Glu
 1 5 10 15

35 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus sp.*

40 <400> 57

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

45 <210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ile o Ala

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Lys, Asp, Glu, Gly, Gln, His o Asn

ES 2 765 302 T3

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Glu o Asp

5

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Gln, Asp, Asn, Thr, Glu, Arg o Gly

10

<400> 58

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de sarcina modificado que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, excepto al menos una mutación, en donde la al menos una mutación está en uno o más de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre y está dentro de un primer epítipo de linfocitos T y/o está en uno o más de los aminoácidos K139, E140 o Q142 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre y está dentro de un segundo epítipo de linfocitos T del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde el primer epítipo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo epítipo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y en donde el polipéptido de sarcina modificado inhibe la síntesis de proteínas y desencadena una respuesta de linfocitos T reducida en comparación con el polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde la inhibición de la síntesis de proteínas se mide usando un ensayo de transcripción y traducción *in vitro* (TTIV) y en donde la respuesta de linfocitos T reducida se refiere a un índice de estimulación (IE) inferior a 1,5 medido mediante un ensayo de proliferación de linfocitos T *in vitro* (incorporación de 3{H}-timidina) usando células mononucleares de sangre periférica humana empobrecidas en CD8+.
2. Un polipéptido de sarcina modificado para su uso en la inhibición de la síntesis de proteínas y el desencadenamiento de una respuesta de linfocitos T reducida en comparación con el polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde el polipéptido de sarcina modificado tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, excepto al menos una mutación, en donde la al menos una mutación está en uno o más de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre y está dentro de un primer epítipo de linfocitos T y/o está en uno o más de los aminoácidos K139, E140 o Q142 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre y está dentro de un segundo epítipo de linfocitos T del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, en donde el primer epítipo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y el segundo epítipo de linfocitos T consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
3. El polipéptido de sarcina modificado de la reivindicación 1 o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 2, en donde la al menos una mutación está dentro del primer epítipo de linfocitos T y está en uno o más de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, opcionalmente en donde el polipéptido de sarcina modificado comprende una mutación en comparación con el polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre.
4. El polipéptido de sarcina modificado o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 3, en donde la al menos una mutación dentro del primer epítipo de linfocitos T es una o más de entre D9A, D9T, Q10K, Q10R, Q10A, P13I, T15G, T15Q, T15H, N16R, N16K, N16A, Y18H, Y18K o Y18R, opcionalmente en donde la al menos una mutación dentro del primer epítipo de linfocitos T es D9T o P13I.
5. El polipéptido de sarcina modificado de la reivindicación 1 o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 2, en donde la al menos una mutación está dentro del segundo epítipo de linfocitos T, en donde la al menos una mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T está en uno o más de los aminoácidos K139, E140 o Q142 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre.
6. El polipéptido de sarcina modificado o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 5, en donde la al menos una mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T es una o más de entre K139D, K139E, K139G, K139Q, K139H, K139N, E140D, Q142D, Q142N, Q142T, Q142E, Q142R o Q142G, opcionalmente en donde la al menos una mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T es Q142T.
7. El polipéptido de sarcina modificado o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 5, en donde la al menos una mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T está en uno o más de los aminoácidos K139, E140 o Q142 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, opcionalmente en donde la al menos una mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T es K139D, K139E, Q142N o Q142T.
8. El polipéptido de sarcina modificado o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido de sarcina modificado es más tóxico que un polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
9. El polipéptido de sarcina modificado de la reivindicación 1 o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 2, en donde al menos una primera mutación está dentro del primer epítipo de linfocitos T y al menos una segunda mutación está dentro del segundo epítipo de linfocitos T, en donde la al menos una primera mutación dentro del primer epítipo de linfocitos T está en uno o más de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, y en donde la al menos una segunda mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T está en uno o más de los aminoácidos K139, E140 o Q142 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, opcionalmente en donde el polipéptido de sarcina modificado comprende dos o tres mutaciones en comparación con el polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre.
10. El polipéptido de sarcina modificado o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 9, en donde la al menos una primera mutación dentro del primer epítipo de linfocitos T es una o más de entre D9A, D9T,

Q10K, Q10R, Q10A, P13I, T15G, T15Q, T15H, N16R, N16K, N16A, Y18H, Y18K o Y18R y la al menos una segunda mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T es una o más de entre K139D, K139E, K139G, K139Q, K139H, K139N, E140D, Q142D, Q142N, Q142T, Q142E, Q142R o Q142G.

- 5 11. El polipéptido de sarcina modificado o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 10, en donde la al menos una primera mutación dentro del primer epítipo de linfocitos T es D9T o P13I y la al menos una segunda mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T es Q142T.
- 10 12. El polipéptido de sarcina modificado o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 9, en donde la al menos una primera mutación dentro del primer epítipo de linfocitos T está en uno o más de los aminoácidos D9, Q10, P13, T15, N16 o Y18 y la al menos una segunda mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T está en uno o más de los aminoácidos K139, E140 o Q142 del polipéptido de α -sarcina de tipo silvestre, opcionalmente en donde la al menos una primera mutación dentro del primer epítipo de linfocitos T es una o más de entre Q10K, N16R, N16K, Y18K o Y18R y la al menos una segunda mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T es una o más de entre K139D, K139E, Q142N o Q142T.
- 15 13. El polipéptido de sarcina modificado o el polipéptido de sarcina modificado para el uso de la reivindicación 12, en donde la al menos una primera mutación dentro del primer epítipo de linfocitos T comprende una primera mutación en el aminoácido Q10 y la al menos una segunda mutación dentro del segundo epítipo de linfocitos T comprende una segunda mutación en el aminoácido K139 y una tercera mutación en el aminoácido Q142, opcionalmente en donde la primera mutación es Q10K, la segunda mutación es K139D o K139E y la tercera mutación es Q142T.
- 20 14. Una composición que comprende el polipéptido de sarcina modificado de cualquiera de entre la reivindicación 1 o las reivindicaciones 3-13 y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 15. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido de sarcina modificado de cualquiera de entre la reivindicación 1 o las reivindicaciones 3-13 conjugado o fusionado con una molécula de direccionamiento, opcionalmente en donde la molécula de direccionamiento es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 30 16. Un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido de sarcina modificado de cualquiera de entre la reivindicación 1 o las reivindicaciones 3-13 o la proteína de fusión de la reivindicación 15.
- 35 17. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 16.
18. Una célula hospedadora transformada con un vector de expresión de la reivindicación 17.
- 40 19. Un método de producción de un polipéptido de sarcina modificado de cualquiera de entre la reivindicación 1 o las reivindicaciones 3-13 o la proteína de fusión de la reivindicación 15, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 18 y purificar el polipéptido de sarcina modificado o proteína de fusión expresada a partir de la célula hospedadora.

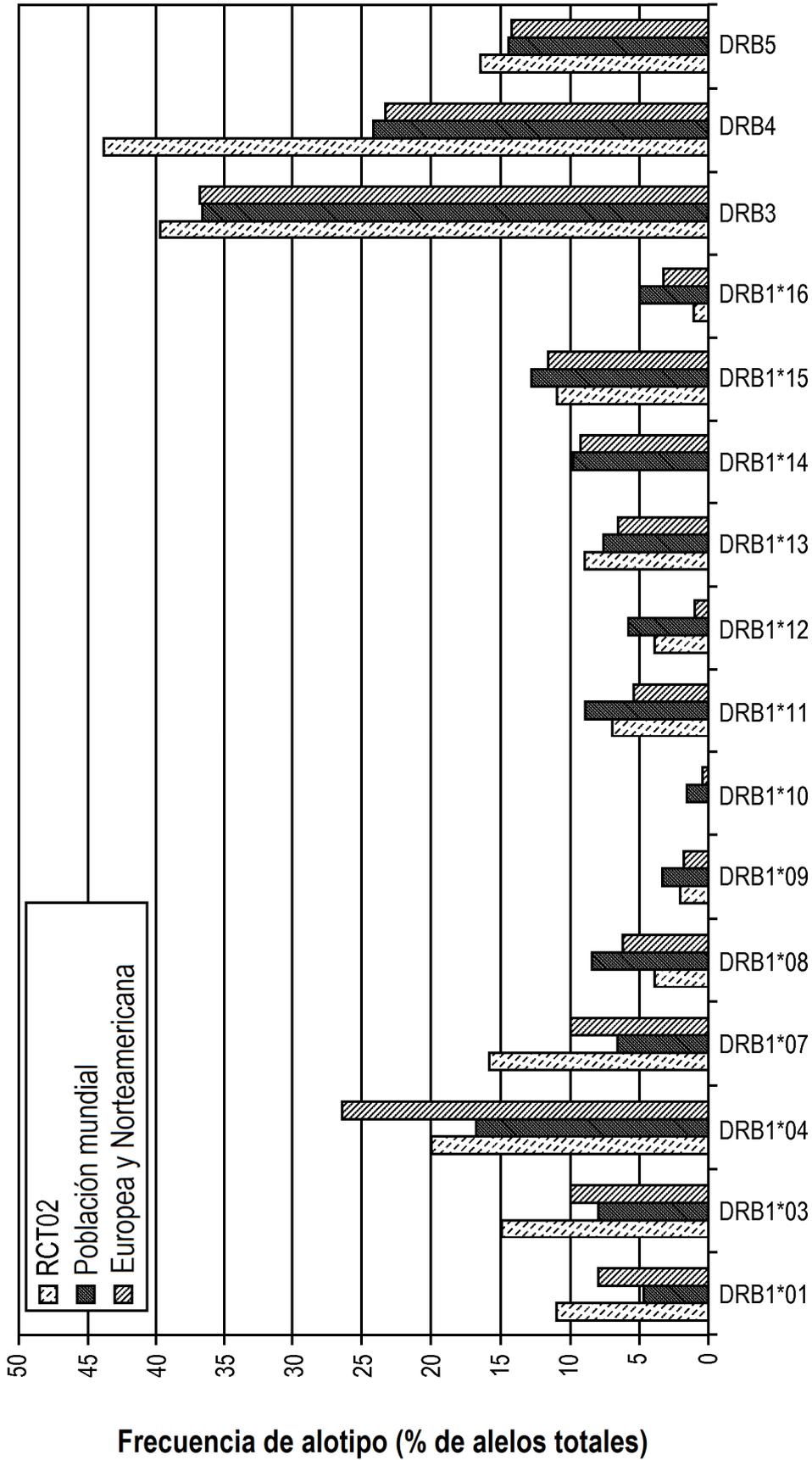


FIG. 1

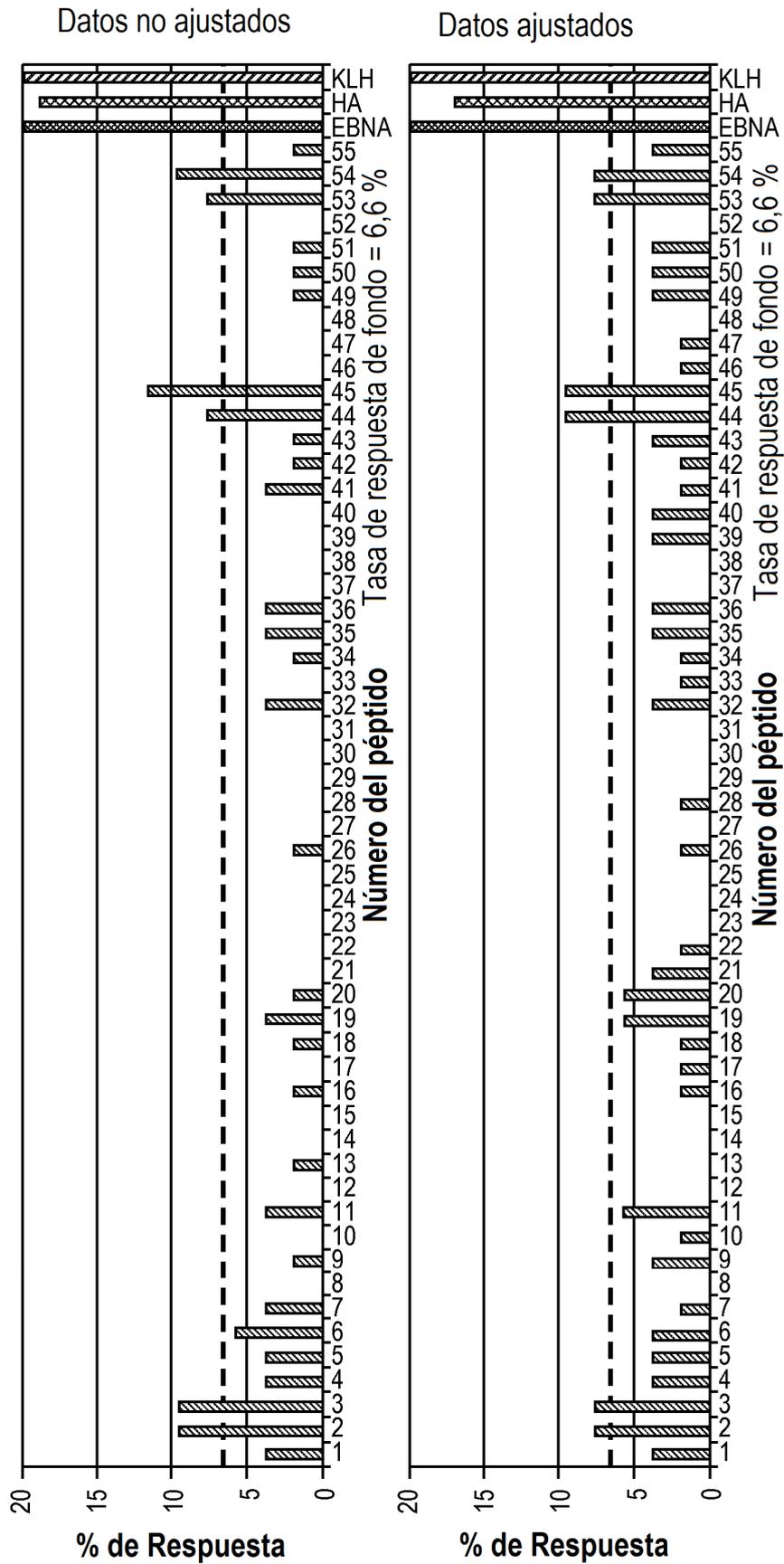
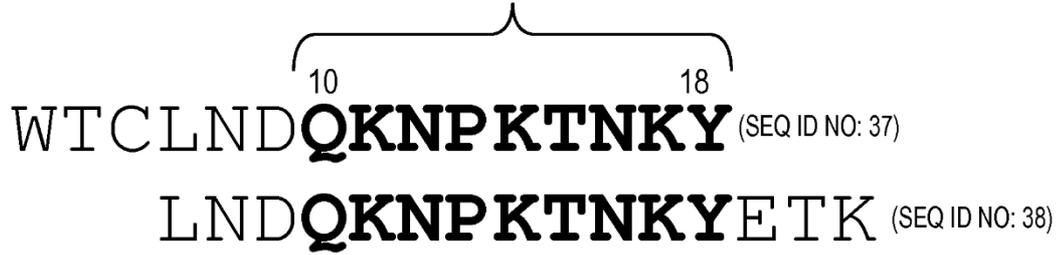


FIG. 2

Nonúmero central previsto de Epítipo 1



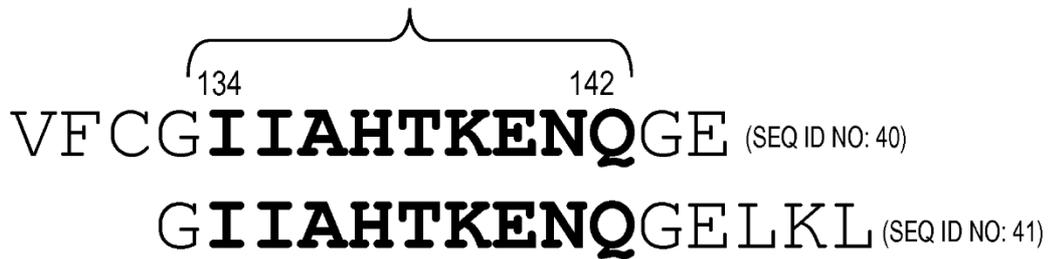
Anclajes de CMH de Clase II: -1 1 4 6 7 9

Mutaciones {

A	K	I	G	R	H
T	R		Q	K	K
A			H	A	R

FIG. 3A

Nonúmero central previsto de Epítipo 2



Anclajes de CMH de Clase II: 1 4 6 7 9

Mutaciones {

A	D	D	D
	E		N
	G		T
	Q		E
	H		R
	N		G

FIG. 3B

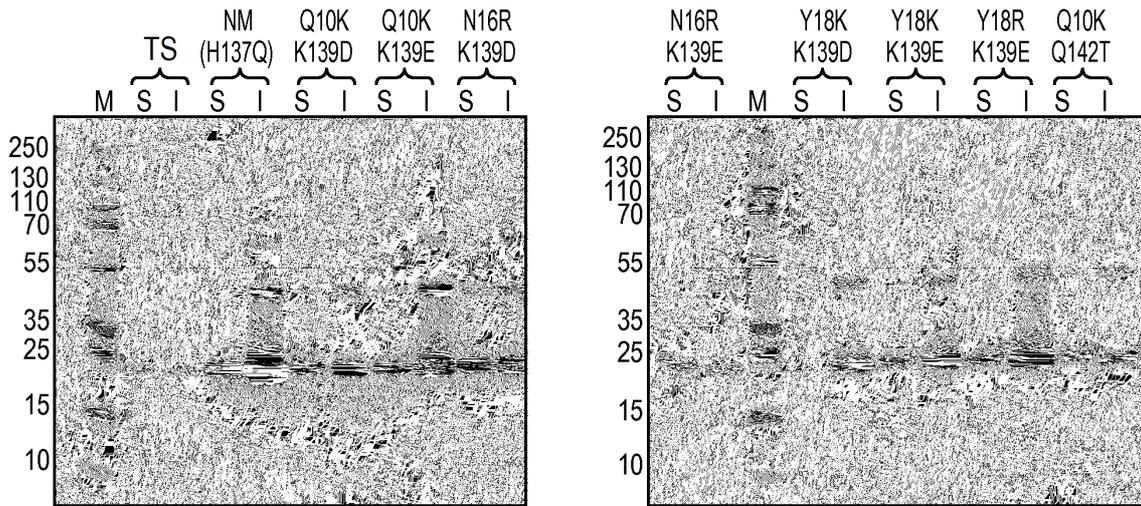


FIG. 4

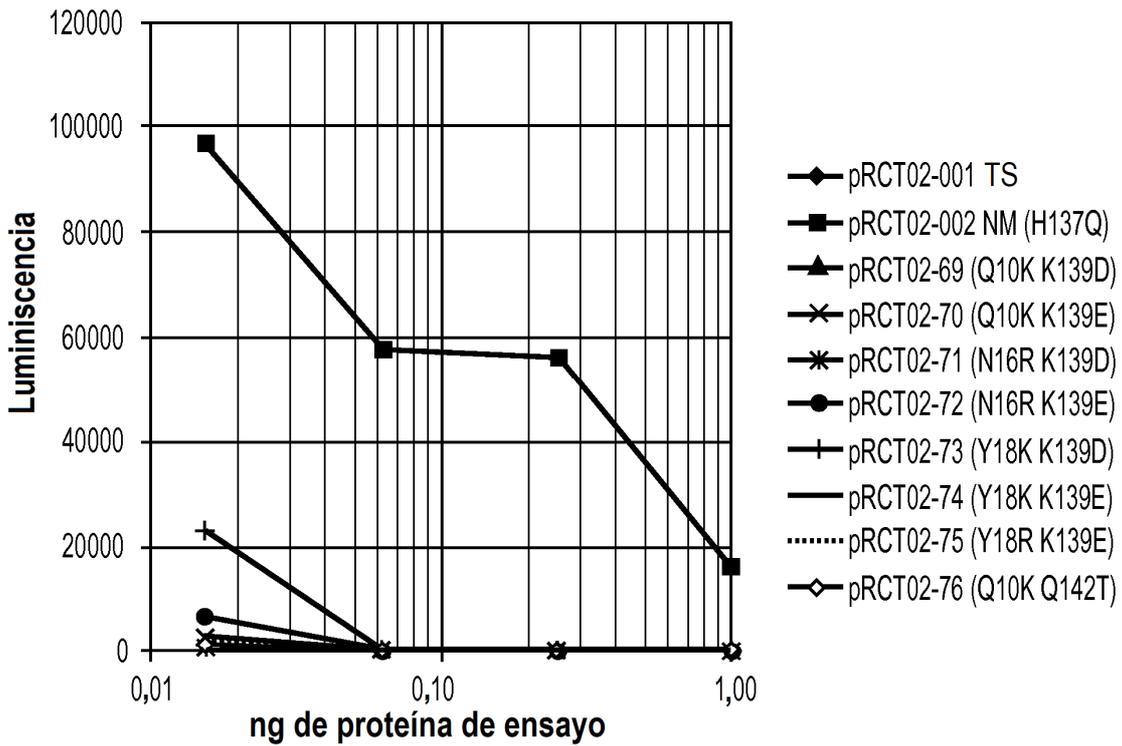


FIG. 5

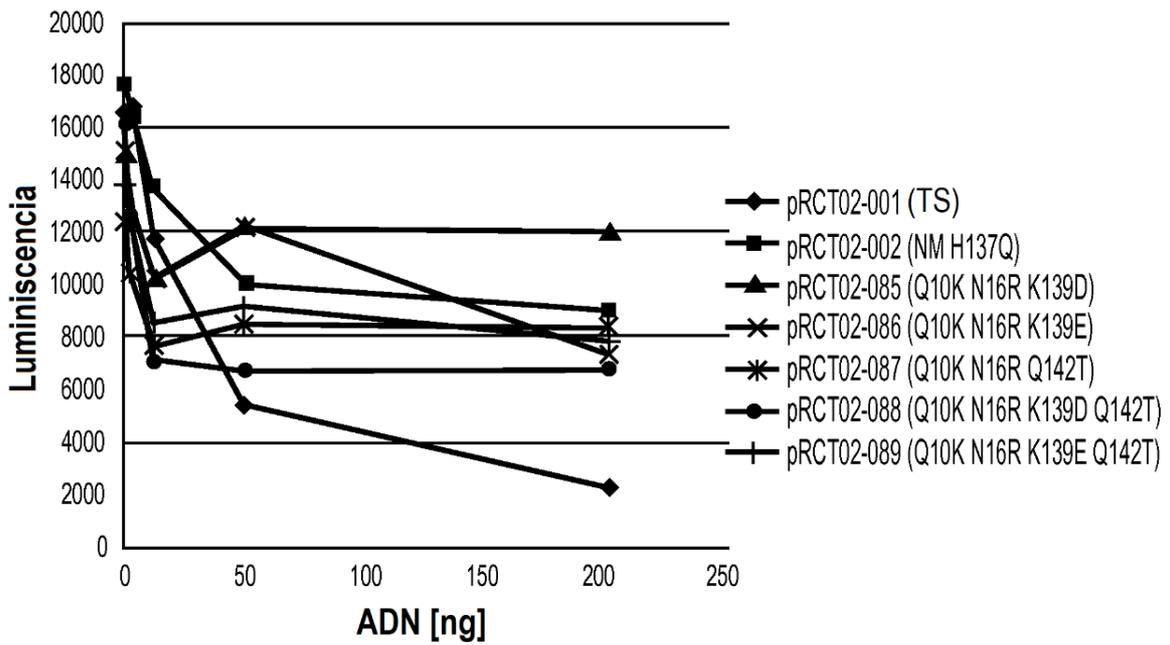
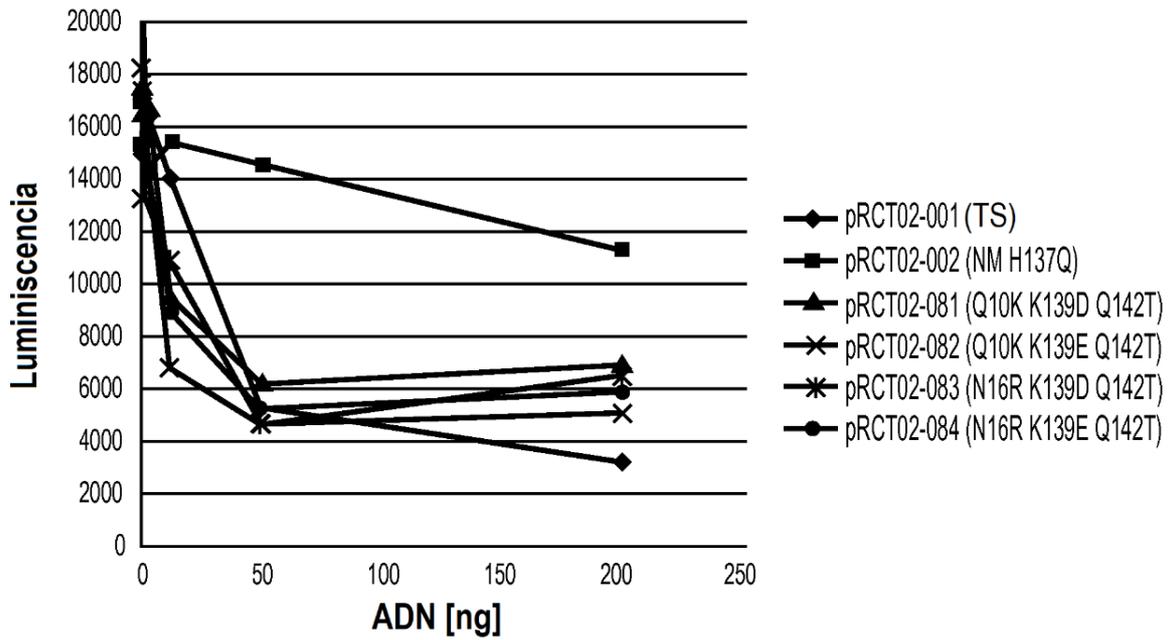


FIG. 6

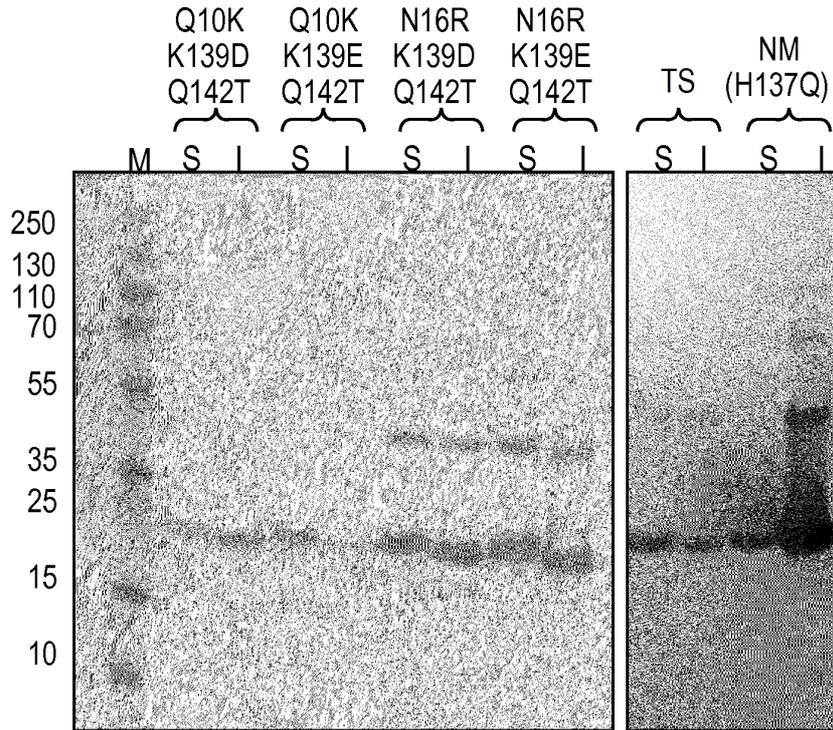


FIG. 7A

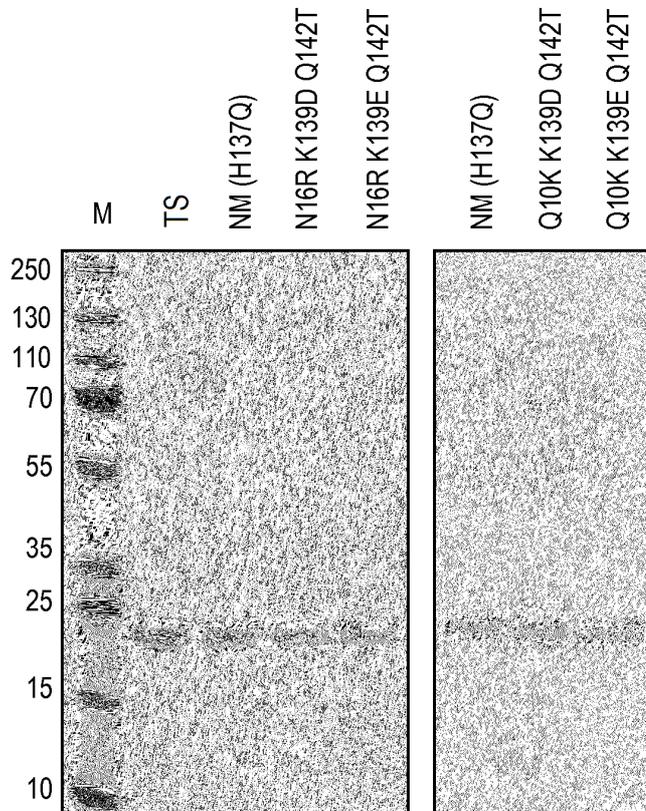


FIG. 7B

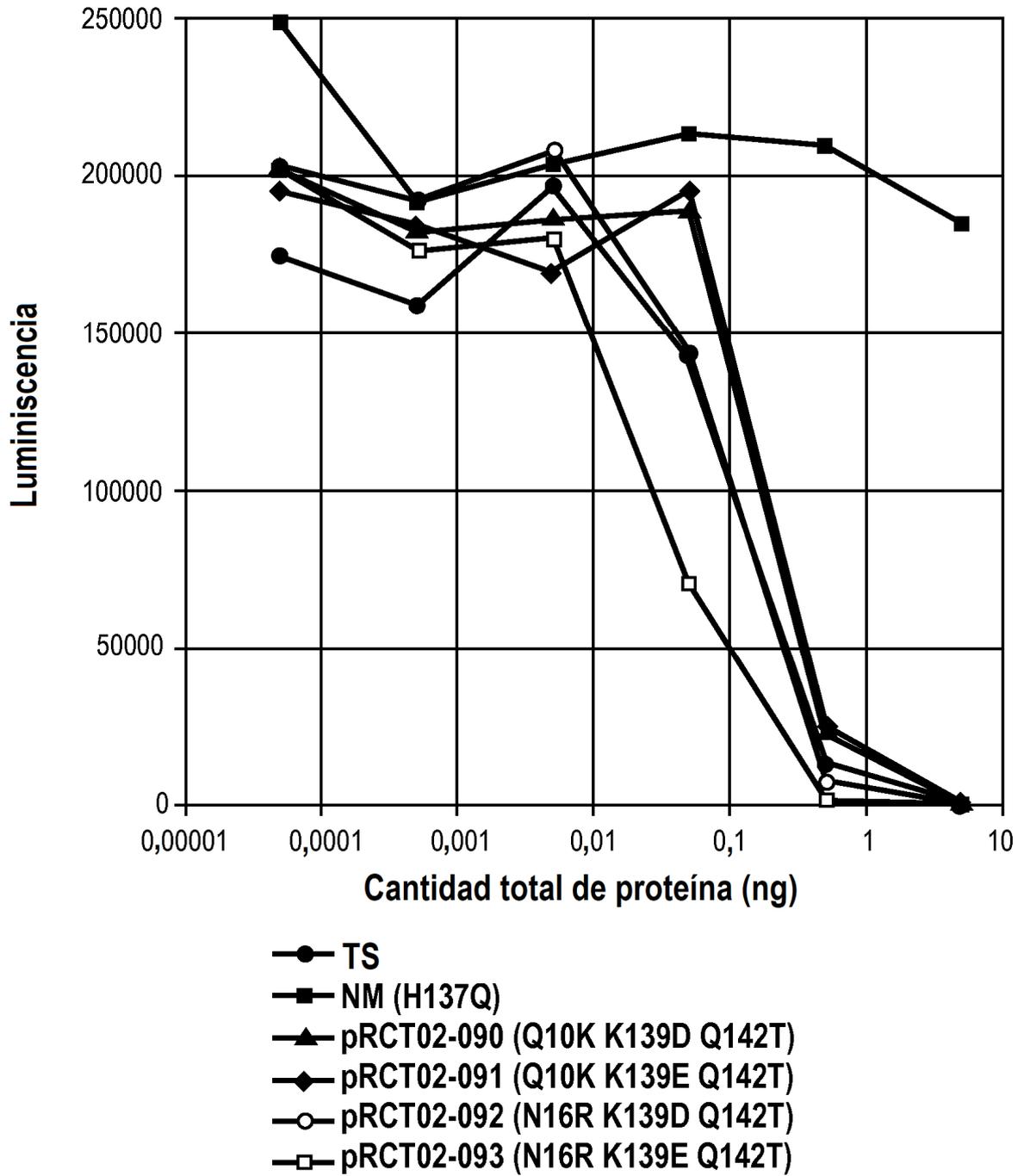


FIG. 8

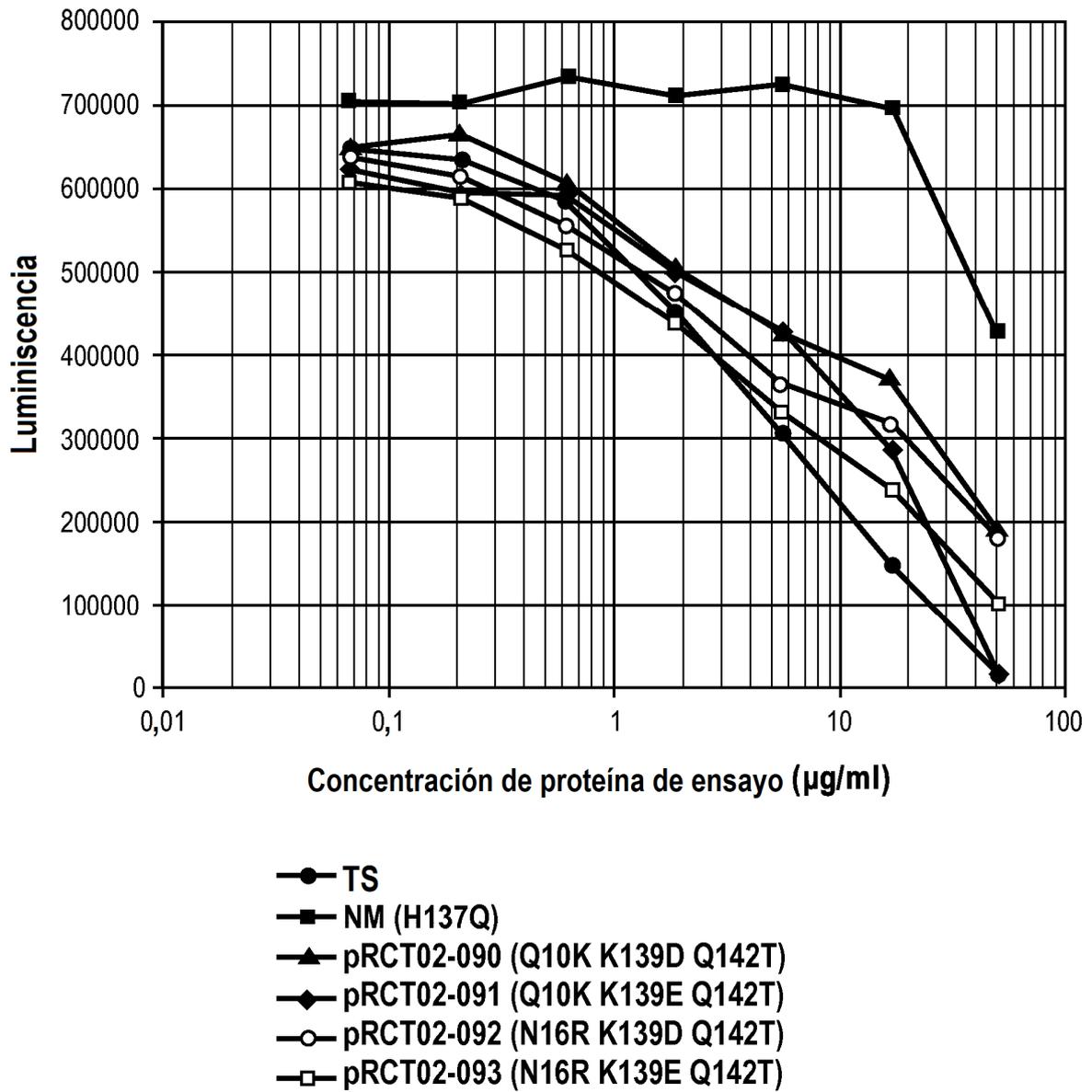


FIG. 9