

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 630**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/40</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/245</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/25</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/08</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/20</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/30</b>	(2006.01)
<b>C07K 16/32</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023231**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164693**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14726015 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2970487**

54 Título: **Proteínas citotóxicas que comprenden regiones de unión de reconocimiento celular y regiones de la subunidad A de la toxina Shiga para la eliminación selectiva de tipos de células específicas**

30 Prioridad:  
**12.03.2013 US 201361777130 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.01.2021**

73 Titular/es:  
**MOLECULAR TEMPLATES, INC. (100.0%)  
9301 Amberglen Boulevard, Suite 100  
Austin, TX 78729, US**

72 Inventor/es:  
**POMA, ERIC;  
WILLERT, ERIN;  
KIM, JASON y  
HIGGINS, JACK**

74 Agente/Representante:  
**SALVÀ FERRER, Joan**

**Observaciones:**

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

**ES 2 800 630 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

Proteínas citotóxicas que comprenden regiones de unión de reconocimiento celular y regiones de la subunidad A de la toxina Shiga para la eliminación selectiva de tipos de células específicas

## CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a proteínas citotóxicas que comprenden regiones de unión de tipo inmunoglobulina y regiones efectoras de toxina Shiga derivadas de Subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas citotóxicas de esta invención se usan para la eliminación selectiva de tipos de células específicas y como agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades, que incluyen cánceres, trastornos inmunes e infecciones microbianas.

## ANTECEDENTES

Las composiciones diseñadas de forma sintética basadas en toxinas naturales se han diseñado en un intento de crear nuevos agentes terapéuticos que exhiban citotoxicidad dirigida después de la administración a un paciente (Pastan I, et al., Annu Rev Med 58: 221-37 (2007)). Las toxinas naturales o versiones truncadas se han fusionado a dominios de inmunoglobulinas o ligandos de receptor a través de modificación recombinante de proteínas (Chaudhary V et al, Nature 339: 394-7 (1989); Strom T et al, Semin Immunol 2: 467-79 (1990); Pastan I et al, Annu Rev Biochem. 61: 331-54 (1992); Foss F et al, Curr Top Microbiol Immunol 234: 63-81 (1998)). Uno de los objetivos de la ingeniería molecular es diseñar moléculas químicas con la doble funcionalidad de: 1) liberación de toxinas a tipos de células o puntos específicos dentro de un organismo después de la administración sistémica; y 2) efectuar una citotoxicidad dirigida a células específicas utilizando mecanismos de citotoxicidad potentes eficaces en células eucariotas.

La familia de toxinas Shiga de toxinas proteicas relacionadas, en particular toxinas aisladas de *S. dysenteriae* y *E. coli* se compone de varias toxinas de origen natural que están estructural y funcionalmente relacionadas (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Por ejemplo, la familia de toxinas Shiga abarca la toxina Shiga verdadera (Stx) aislada de *S. dysenteriae* serotipo 1, variantes de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT1 o Stx1 o SLT1 o Stx-1) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica y y variantes de la toxina semejante a Shiga 2 (SLT2 o Stx2 o SLT2) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica. SLT1 difiere por sólo un residuo de Stx, y ambas han sido referidas como Verocitotoxinas o Verotoxinas (VTS) (O'Brien A et al, Curr Top Microbiol Immunol. 180: 65-94 (1992)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparten la misma estructura general y mecanismo de acción (Engedal N et al, Microbial Biotech. 4: 32-46 (2011)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga contienen dominios de reconocimiento que se unen preferentemente a un glicosíngolípido específico presente en la superficie de algunas células huésped y un dominio enzimático capaz de inactivar permanentemente ribosomas una vez dentro de una célula (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)).

Los miembros de la familia de toxinas Shiga son empleados por las bacterias como factores de virulencia durante la infección de un huésped (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). En un huésped infectado, las toxinas Shiga son citotóxicas debido a la potente capacidad de las toxinas para inhibir la síntesis de proteínas y para desencadenar la muerte celular apoptótica (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Los potentes efectos citotóxicos de las toxinas Shiga en las células huésped pueden dar como resultado colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)).

Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparte una estructura proteica común multimérica caracterizada por una disposición A(B)<sub>5</sub> de subunidades de proteína de Shiga (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Cada toxina Shiga se compone de dos subunidades de la proteína, A y B, que se asocian en una disposición A(B)<sub>5</sub> para formar un complejo de proteínas holotoxina. La subunidad A de la toxina Shiga es un monómero de 32 kilodaltons que contiene un dominio enzimático, y la subunidad B de la toxina Shiga es una subunidad de 7,7 kilodaltons que se asocia con otras cuatro subunidades B de la toxina Shiga para formar un pentámero de subunidades B de la toxina Shiga. El pentámero de subunidades B se asocia con una subunidad A para formar la holotoxina Shiga que tiene aproximadamente 70 kilodaltons (O'Brien A, Holmes, R, Microbiol Rev 51: 206-20 (1987)).

Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparten un proceso común para la intoxicación de una célula huésped que puede dividirse en cinco fases principales: la unión a la superficie celular, la endocitosis, el movimiento subcelular retrógrado al retículo endoplasmático, la translocación del retículo endoplasmático al citosol y la inactivación enzimática de los ribosomas en el citosol. En primer lugar, las holotoxinas Shiga se dirigen a las superficies celulares de células huésped específicas por la capacidad de la subunidad B para unirse específicamente al glicosíngolípido globotriaosilceramida Gb3, también conocido como CD77, presente en la parte de la membrana exoplásmica (Ling, H et al, Biochemistry 37: 1777-88 (1998); Thorpe C et al, Infect Immun. 67: 5985-93 (1999); Soltik A et al, J Biol Chem 277: 5351-59 (2002)). En segundo lugar, las holotoxinas Shiga explotan la maquinaria endocítica de la célula huésped para entrar en la célula huésped, donde las holotoxinas están contenidas inicialmente dentro de los endosomas (Sandvig K et al, J Cell Biol. 108: 1331-1343 (1989); Sandvig K et

al., *Histochem Cell Biol* 117: 131-141 (2002)). En tercer lugar, las holotoxinas Shiga explotan la maquinaria del transporte intracelular de la célula huésped para alcanzar el retículo endoplásmico y obtener acceso al citosol (Nichols B et al, *J Cell Biol* 153: 529-41 (2001); Lauvrak S et al, *J Cell Sci.* 117: 2321-31 (2004); Saint-Pol A et al, *Dev Cell* 6: 525-38 (2004)). En cuarto lugar, los fragmentos enzimáticamente activos de las holotoxinas Shiga se retrotranslocan desde el lumen del retículo endoplásmico al citosol (Yu M, Haslam D, *Infect Immun* 73: 2524-32 (2005); LaPointe P et al, *J Biol Chem* 280: 23310 -18 (2005); Falguieres T, Johannes L, *Biol Cell* 98: 125-34 (2006); Tam P, Lingwood C, *Microbiology* 153: 2700-10 (2007)). En quinto lugar, la fracción citosólica de los fragmentos enzimáticamente activos de la toxina Shiga provoca citotoxicidad mediante la inactivación de los ribosomas de la célula huésped (Tam, *Microbiology* 153: 2700-10 (2007)).

Durante el proceso de intoxicación por la toxina Shiga, la subunidad A de la toxina Shiga es escindida proteolíticamente entre un residuo de arginina conservado y un residuo de metionina (por ejemplo, Arg251-Met252 en StxA) por furina, una endoproteasa de la célula huésped (Garred Ø et al., *J Biol Chem* 270: 10817-21 (1995)). El fragmento amino-terminal de la subunidad A de la toxina Shiga escindida por furina se llama "fragmento A1" de la toxina Shiga (o Stxn-A1, SLTn-A1, SLT-nA1). El fragmento A1 de la toxina Shiga es una proteína de 28 kilodaltons que contiene el dominio catalítico de la toxina Shiga (Fraser M et al, *Nat Struct Biol.* 1: 59-64 (1994)). El mecanismo de citotoxicidad de las toxinas Shiga a las células huésped es predominantemente a través de la potente inactivación catalítica del fragmento A1 de los ribosomas eucariotas y la inhibición en toda la célula de la síntesis de proteínas (Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010)).

El fragmento A1 de la toxina Shiga inhibe la traducción de proteínas mediante su potente actividad de despurinación hacia una nucleobase de adenina universalmente conservada en la posición 4324 en el bucle de alfa-sarcina-ricina del ARN ribosomal 28S de los ribosomas eucariotas (Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010)). Después de inactivar un número umbral de ribosomas, se predice que la célula huésped experimenta una reducción suficiente en la síntesis de proteínas para inducir la muerte celular a través de apoptosis (Iordanov M et al, *Mol Cell Biol.* 17: 3373-81 (1997); Smith W et al., *Infect Immun.* 71: 1497-504 (2003); Lee S et al, *Microbiol Cell* 10: 770-80 (2008); Tesh V, *Future Microbiol* 5: 431-53 (2010)).

Una toxina A-B que inactiva ribosomas puede inutilizar un ribosoma tras otro en la misma célula a una velocidad de aproximadamente 1.500 ribosomas por minuto (Endo Y, Tsurugi K. *Eur. J Biochem* 171: 45-50 (1988); Endo Y et al., *J. Biol Chem* 263:8735-9 (1988)). Se ha descrito que la potencia de las toxinas A-B es extremadamente alta, de manera que tan poco como una molécula de toxina puede eliminar una célula (Yamaizumi M et al, *Cell* 15: 245-50 (1978); Antignani A, Fitzgerald D, *Toxins* 5: 1486-502 (2013)). Se cree que una única molécula de toxina A-B puede inactivar irreversiblemente 300 ribosomas en 35 minutos y es suficiente para eliminar una célula de cáncer (ver Weldon J, Pastan I, *FEBS Journal* 278: 4683-700 (2011)). Este nivel de potencia citotóxica se predice adicionalmente para la subunidad A de la toxina Shiga para la que se ha sugerido que una molécula translocada en el citosol sería suficiente para eliminar una célula (Tam, *Microbiology* 153: 2700-10 (2007)).

Las holotoxinas de la familia de toxinas Shiga se prevé que sean demasiado tóxicas para un uso no dirigido como agente terapéutico (Jain, R, *Tumor physiology and antibody delivery*, *Front Radiat Ther Oncol* 24: 32-46 (1990)). Sin embargo, los miembros de la familia de toxinas Shiga tienen el potencial de diseñarse de forma sintética para aplicaciones terapéuticas racionales mediante alteraciones de la estructura, características y actividades biológicas de la toxina (Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010); Engedal *Microbiana Biotech* 4: 32-46 (2011)). Las holotoxinas Shiga tienen una estructura bipartida compuesta de dos partes modulares unidas de forma no covalente: un resto A que contiene el fragmento A1 enzimáticamente activo y un resto B que contiene sitios de unión a la diana de la superficie celular Gb3. Debido a que las subunidades de la toxina Shiga son modulares, se ha planteado la hipótesis de que las composiciones terapéuticas pueden crearse en base a las estructuras y funciones separadas de los restos A y B (Solicitud de Estados Unidos 20090156417 A1; Johannes, *Nat Rev Microbiol* 8: 105-16 (2010); Engedal, *Microbial Biotech* 4: 32-46 (2011); solicitud EP 2402367 A1; solicitud de Estados Unidos 20130196928 A1.

El resto A de los miembros de la familia de toxinas Shiga es estable, enzimáticamente activo y citotóxico independiente de cualquier resto B (Engedal, *Microbial Biotech* 4: 32-46 (2011)). La subunidad A de la toxina Shiga 1 es catalíticamente activa, capaz de inactivar enzimáticamente ribosomas *in vitro* y citotóxica incluso si está truncada o fusionada con otros dominios de la proteína (Haddad J et al, *J Bacteriol.* 175: 4970-8 (1993); Al-Jaufy A et al, *Infect Immun* 62: 956-60 (1994); al-Jaufy A et al, *Infect Immun.* 63: 3073-8 (1995); LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005); Di R et al, *Toxicon* 57: 525-39 (2011)). Los truncamientos de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 son catalíticamente activos, capaces de inactivar los ribosomas enzimáticamente *in vitro* y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)).

La idea de la unión de una toxina a un dominio de reconocimiento para producir una molécula quimérica que mata selectivamente células de cáncer no es nueva (Strebhardt K, Ullrich A, *Nat Rev Cancer* 8: 473-80 (2008)). Por ejemplo, desde los años 70 se han desarrollado inmunotoxinas utilizando tres candidatos de toxinas principales: la toxina de la difteria bacteriana, la exotoxina bacteriana de *Pseudomonas* y toxinas de plantas ejemplificadas por la ricina (Antignani, *Toxins* 5: 1486-502 (2013)). En 2013, sin embargo, estas tres toxinas permanecieron "entre las mejores opciones para el desarrollo de inmunotoxinas" (Antignani, *Toxins* 5: 1486-502 (2013)). Hasta la fecha, nadie

ha descrito una proteína citotóxica que comprenda una secuencia de aminoácidos derivada de una toxina Shiga combinada con una región de unión derivada de inmunoglobulina dirigida a células que sea capaz de eliminar específica y selectivamente un tipo de célula diana en un vertebrado o incluso un laboratorio, entorno de cultivo celular. Sería deseable tener proteínas citotóxicas que comprendan regiones de toxina Shiga capaces de matar células diana para el desarrollo de moléculas terapéuticas efectivas y para usar como moléculas terapéuticas para el tratamiento de una variedad de enfermedades. Vallera et al. (2010) describe la bioingeniería de una toxina dirigida biespecífica desimmunizada única que reconoce simultáneamente los receptores humanos CD22 y CD19 en un modelo de ratón de metástasis de células B. Cizeau et al. (2012) describe la ingeniería y la caracterización biológica de deBouganin unidas con el fragmento Fab anti-EpCAM, y su aplicación en oncología.

## DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona varias proteínas citotóxicas para la eliminación selectiva de tipos de células específicas, comprendiendo las proteínas 1) regiones de unión de tipo inmunoglobulina, tal como se define en las reivindicaciones, tales como de inmunoglobulinas, y 2), regiones efectoras de las toxinas Shiga, tal como truncamientos de SLT-1A, tal como se define en las reivindicaciones. La unión de las regiones de unión con los polipéptidos derivados de la subunidad A de las toxinas Shiga permitió el diseño de moléculas citotóxicas basadas en la toxina Shiga capaces de dirigirse a tipos de células específicas. Las proteínas citotóxicas de la invención se utilizan para la eliminación celular dirigida y como agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, que incluyen cánceres, trastornos inmunes e infecciones microbianas.

Una proteína citotóxica de la invención comprende (a) una región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende uno o más polipéptidos y es capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular, tal como se define en las reivindicaciones, y (b) una región efectora de toxinas Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la Subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga, tal como se define en las reivindicaciones.

Para ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un: fragmento de anticuerpo de dominio único, fragmento variable de cadena única, un fragmento variable de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y fragmento Fd.

Tal como se define en las reivindicaciones, tras la administración de la proteína citotóxica de la invención a una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina de la proteína citotóxica, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte de la célula.

En ciertas realizaciones, tras la administración de la proteína citotóxica a dos poblaciones diferentes de tipos de células con respecto a la presencia de una biomolécula diana extracelular, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte celular a los tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de su región de tipo inmunoglobulina en un  $CD_{50}$  al menos tres veces o menos que la  $CD_{50}$  a tipos de células que no están físicamente acopladas con una biomolécula diana extracelular de su región de unión de tipo inmunoglobulina.

En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina está diseñada o es seleccionada por su capacidad para unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, endoglina, proteína activada por fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, gpA33, mucina, TAG-72, anhidrasa carbónica IX, proteína de unión a folato, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido Lewis-Y2, VEGFR, Alfa Vbeta3, Alfa5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, tenascina, CD64 y mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, beta-catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus de Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfa-fetoproteína, 17-A1, antígeno de tumor de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FceRIa, galectina-9, mpr-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, CD193, TLR4, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD15, CD33, CD64, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, CD11a-c, GITRL, molécula MHC Clase II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2, CD11c, CD123 y cualquier fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores..

Para ciertas realizaciones, las proteínas citotóxicas comprenden la región efectora de toxinas Shiga que comprende o que consiste en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3. Otras realizaciones son proteínas citotóxicas en las que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 241 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; y/o aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones, las proteínas citotóxicas comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste en los aminoácidos 269-508 de la SEQ ID NO: 4. Otras realizaciones son las proteínas citotóxicas que comprenden o que consisten en SEQ ID NO: 4.

5 En ciertas realizaciones, las proteínas citotóxicas comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste en los aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 5. Otras realizaciones son las proteínas citotóxicas que comprenden o que consisten en SEQ ID NO: 5.

10 En ciertas realizaciones, las proteínas citotóxicas comprenden regiones efectoras de toxinas Shiga que comprenden una mutación con relación a una subunidad A de origen natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia la actividad enzimática de la región efectora de toxinas Shiga al tiempo que conserva una actividad citotóxica, la mutación seleccionada de la eliminación o sustitución de al menos un residuo de aminoácido, tal como se define en las reivindicaciones.

15 La invención también incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína citotóxica de la invención y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, tal como se define en las reivindicaciones; y el uso de dicha proteína citotóxica en los procedimientos de la invención, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, y tal como se define en las reivindicaciones.

20 Más allá de las proteínas citotóxicas de la presente invención, los polinucleótidos que son capaces de codificar una proteína citotóxica de la invención están dentro del alcance de la presente invención, así como vectores de expresión que comprenden un polinucleótido de la invención y células huésped transformadas que comprenden un vector de expresión de la invención, tal como se define en las reivindicaciones.

25 Adicionalmente, la presente invención proporciona procedimientos in vitro de eliminación de célula o células que comprende la etapa de poner en contacto una célula o células con una proteína citotóxica de la invención, tal como se define en las reivindicaciones.

30 Además, la presente invención proporciona el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones en un paciente en necesidad del mismo usando una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína citotóxica o una composición farmacéutica de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección se selecciona de cualquiera de los siguientes: un cáncer, tumor, trastorno inmunitario o infección microbiana. En ciertas realizaciones, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hematológico, cáncer de riñón, cáncer del tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer uterino. En ciertas realizaciones, el trastorno inmunitario a tratar es un trastorno inmunitario asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, shock séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa y vasculitis.

45 Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una proteína citotóxica o una composición farmacéutica que comprende dicha proteína para uso en el tratamiento o la prevención de un cáncer, trastorno inmunitario, o infección microbiana, tal como se define en las reivindicaciones.

50 Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, reivindicaciones adjuntas y figuras adjuntas. Los elementos de la invención mencionados anteriormente podrían combinarse o eliminarse libremente para formar otras realizaciones de la invención dentro del alcance de las reivindicaciones, sin ninguna declaración para objetar dicha combinación o eliminación en lo sucesivo.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS Y FIGURAS

55 La **figura 1** muestra la arquitectura general de proteínas citotóxicas de ejemplo.  
 La **figura 2** muestra gráficamente que "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" era específicamente citotóxico para las células CD38+ en comparación con las células CD38-. El porcentaje de viabilidad de las células se representó sobre el logaritmo en base 10 de la concentración de proteína citotóxica.  
 60 La **figura 3** muestra gráficamente que "αHER2-V<sub>HH</sub> fusionado con SLT-1A" era específicamente citotóxico para las células HER2+ en comparación con las células HER2-. El porcentaje de viabilidad de las células se representó sobre el logaritmo en base 10 de la concentración de proteína citotóxica.  
 La **figura 4** muestra gráficamente el cambio en la luminiscencia corporal total con la administración de αCD20scFv fusionado con las versiones 1 y 2 de SLT-1A en un modelo de xenoinjerto de Raji-luc diseminado.

La **figura 5** muestra gráficamente el aumento de la supervivencia de ratones modelo de xenoinjerto Raji-luc con la administración de  $\alpha$ CD20scFv fusionado con las versiones 1 y 2 de SLT-1A.

La **figura 6** muestra gráficamente el cambio en el volumen del tumor con la administración de  $\alpha$ CD20scFv fusionado con versiones 1 y 2 de SLT-1A en un modelo de xenoinjerto subcutáneo Raji.

5 La **figura 7** muestra el agotamiento de células B en un estudio de primates no humanos con la administración de  $\alpha$ CD20scFv::SLT-1A versión 1. Específicamente, se analizó el subconjunto de células B CD20+ que expresaban CD21.

10 La **figura 8** muestra el agotamiento de células B en un estudio de primates no humanos con la administración de  $\alpha$ CD20scFv::SLT-1A versión 1. Específicamente, se analizó el subconjunto de células B CD20+ que no expresaban CD21.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 La presente invención se describe más completamente en lo sucesivo usando realizaciones ilustrativas, no limitantes, y las referencias a las figuras adjuntas. Sin embargo, esta invención puede realizarse de muchas formas diferentes dentro del alcance de la invención y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones establecidas a continuación. Por el contrario, estas realizaciones se proporcionan de modo que esta descripción sea exhaustiva y transmita el alcance de la invención a los expertos en la materia.

20 A fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, ciertos términos se definen a continuación. Se pueden encontrar definiciones adicionales dentro de la descripción detallada de la presente invención.

25 Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, los términos "un", "una" y "el/la" incluyen tanto los referentes singular y plural, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

30 Tal como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" cuando se refiere a dos especies, A y B, significa al menos uno de A y B. Tal como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, el término "y/o" cuando hace referencia a más de dos especies, tales como A, B, y C, significa al menos uno de A, B, o C, o al menos uno de cualquier combinación de A, B, o C (con cada especie en posibilidad singular o múltiple).

35 A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra "comprender" o variaciones tales como "comprende" o "que comprende" se entenderán que implican la inclusión de un número entero (o componentes) o grupo de números enteros (o componentes) indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero (o componentes) o grupo de números enteros (o componentes).

40 En toda esta memoria descriptiva, el término "que incluye" se usa para significar "que incluye, pero no limitado a". "Que incluye" y "que incluye, pero no limitado a" se utilizan indistintamente.

45 El término "residuo de aminoácido" o "aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido. El término "polipéptido" incluye cualquier polímero de aminoácidos o residuos de aminoácidos. El término "secuencia de polipéptido" se refiere a una serie de aminoácidos o residuos de aminoácidos que comprenden físicamente un polipéptido. Una "proteína" es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptido. Un "péptido" es un pequeño polipéptido de tamaño de menos de un total de 15-20 residuos de aminoácidos.

50 Los términos "aminoácido", "residuo de aminoácido" o secuencias de polipéptidos incluyen aminoácidos de origen natural y, a menos que se limite de otro modo, también incluyen análogos conocidos de aminoácidos naturales que pueden funcionar de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos referidos en este documento por designaciones taquigráficas se indican a continuación en la Tabla A:

TABLA A: Nomenclatura de aminoácidos

Nombre	3 letras	1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico o aspartate	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico o glutamato	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I

Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

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

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

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

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

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

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

### 30 I. La estructura general de la proteína citotóxica.

La presente invención proporciona varias proteínas citotóxicas para la eliminación selectiva de tipos de células específicas, comprendiendo cada proteína 1) una región de unión de tipo inmunoglobulina para el reconocimiento celular, tal como se define en las reivindicaciones; y 2) una región efectora de toxinas Shiga, tal como se define en las reivindicaciones. La unión de las regiones de unión del tipo de inmunoglobulina de reconocimiento celular con las regiones derivadas de la subunidad A de toxina Shiga permite el diseño del reconocimiento específico del tipo de célula de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga. Las proteínas citotóxicas de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, comprenden regiones efectoras de toxinas Shiga derivadas de las subunidades A de miembros de la familia de toxinas Shiga unidas a regiones de unión de tipo inmunoglobulina que pueden unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular en asociación física con un célula, tal como una biomolécula diana expresada en la superficie de una célula. Esta estructura general es modular en el sentido de que cualquier número de regiones de unión de tipo inmunoglobulina diversas puede unirse a regiones efectoras derivadas de la subunidad A de toxinas Shiga para producir variaciones de la misma estructura general.

#### 45 A. Regiones de unión de tipo inmunoglobulina

Las proteínas citotóxicas de la invención comprenden una región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende uno o más polipéptidos capaces de unirse de manera selectiva y específica a una biomolécula diana extracelular, tal como se define en las reivindicaciones. El término "región de unión de tipo inmunoglobulina", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una región de polipéptido capaz de unirse a una o más biomoléculas diana, tales como un antígeno o epítipo. Las regiones de unión de tipo inmunoglobulina pueden definirse funcionalmente por su capacidad para unirse a moléculas diana. Las regiones de unión de tipo inmunoglobulina derivan comúnmente de anticuerpo o estructuras similares a anticuerpos; sin embargo, se contemplan andamios estructurales alternativos de

otras fuentes dentro del alcance del término.

Las proteínas de inmunoglobulina (Ig) tienen un dominio estructural conocido como un dominio de Ig. Los dominios de Ig varían en longitud desde aproximadamente 70-110 residuos de aminoácidos y poseen un característico pliegue de Ig, en el que típicamente de 7 a 9 cadenas beta antiparalelas se disponen en dos láminas beta, que forman una estructura tipo sándwich. El pliegue de Ig se estabiliza mediante interacciones de aminoácidos hidrófobos en las superficies interiores del sándwich y enlaces disulfuro altamente conservados entre residuos de cisteína en las cadenas. Los dominios de Ig pueden ser variables (IgV o grupo V), constante (IgC o grupo C) o intermedio (IgI o grupo I). Algunos dominios de Ig pueden estar asociados con una región determinante de la complementariedad (CDR), también llamada región determinante de unión a antígeno (ABR), que es importante para la especificidad de la unión de anticuerpos a sus epítomos. Los dominios de tipo Ig también se encuentran en proteínas no inmunoglobulinas y se clasifican sobre esa base como miembros de la superfamilia de proteínas Ig. El comité de nomenclatura de genes HUGO (HGNC) proporciona una lista de los miembros de la familia que contienen el dominio de tipo Ig.

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

Hay numerosas regiones de unión de tipo inmunoglobulina contempladas como componentes de la presente invención. En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina deriva de una región de unión de inmunoglobulina capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas otras realizaciones de la descripción, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido diseñado no derivado de cualquier dominio de inmunoglobulina, pero que funciona como una región de unión de inmunoglobulina al proporcionar una unión de alta afinidad a una biomolécula diana extracelular. Este polipéptido diseñado puede incluir opcionalmente andamios estructurales de polipéptido que comprenden o que consisten esencialmente en las regiones determinantes de complementariedad de las inmunoglobulinas, tal como se describe en el presente documento.

También hay numerosas regiones de unión derivadas de inmunoglobulina y polipéptidos diseñados de no inmunoglobulinas en la técnica anterior que son útiles para el direccionamiento de polipéptidos a tipos de células específicas a través de sus capacidades de unión con alta afinidad. La región de unión de tipo inmunoglobulina de las presentes proteínas citotóxicas se selecciona entre el grupo que incluye: fragmentos de anticuerpos de dominio único, fragmentos variables de cadena única (scFv), fragmentos variables de anticuerpo (Fv), fragmentos de unión a antígeno (fab) y fragmentos Fd (véase, Weiner L, Cell 148: 1081-4 (2012); Ahmad Z et al, Clin Dev Immunol 2012: 980 250 (2012), para revisiones).

De acuerdo con ciertas otras realizaciones de la descripción, la región de unión de tipo inmunoglobulina incluye andamios diseñados alternativos a dominios de inmunoglobulina que presentan características funcionales similares, tales como unión de alta afinidad y específica de biomoléculas diana, y permite la ingeniería de características mejoradas, tales como mayor estabilidad o inmunogenicidad reducida. Para ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas descritas en el presente documento, la región de unión de tipo inmunoglobulina se selecciona del grupo que incluye el 10<sup>o</sup> dominio diseñado de fibronectina tipo III (10Fn3) derivado de fibronectina (monocuerpos, AdNectins™ o AdNexins™); dominio diseñado de tenascina tipo III derivado de tenascina (Centryns™); polipéptido diseñado que contiene el motivo de repetición de anquirina (DARPin™); dominio A diseñado derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR-A) (Avimers™), lipocalina (anticalinas), dominio Kunitz diseñado derivado de inhibidor de proteasa; dominio Z diseñado derivado de Proteína A (Affibodies™); andamio estructural diseñado derivado de gamma B cristalina o andamio estructural diseñado derivado de ubiquitina (Affilins); polipéptidos derivados de Sac7d (Nanofitins® o afitinas); dominio SH2 diseñado derivado de Fyn (Fynomers®); y mimético de anticuerpo manipulado y cualquier homólogo genéticamente manipulado de cualquiera de los anteriores que retienen su funcionalidad de unión (Wörn A, Plückthun A, J Mol Biol 305: 989-1010 (2001); Xu L et al., Chem Biol 9: 933-42 (2002); Wikman M et al, Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Binz H et al, Nat Biotechnol 23: 1257-1268 (2005); Holliger P, Hudson P, Nat Biotechnol. 23: 1126-1136 (2005); Gill D, Damle N, Curr Opin Biotech 17: 653-8 (2006); Koide A, Koide S, Methods Mol Biol 352: 95-109 (2007).

Cualquiera de las regiones de unión de tipo inmunoglobulina se puede usar como un componente de la presente invención siempre que el componente de región de unión tenga una constante de disociación de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-</sup>



<sup>12</sup> moles/litro, preferiblemente menos de 200 nM, hacia una biomolécula diana extracelular, tal como se describe en este documento.

Este sistema es modular, en que varios, diversas regiones de unión de tipo inmunoglobulina pueden ser utilizadas con la misma región efectora de toxina Shiga para proporcionar un reconocimiento diverso de diversas biomoléculas diana extracelular y por lo tanto el direccionamiento de la citotoxicidad o citostasis a diversos tipos de células diversos.

#### B. Regiones efectoras de toxinas Shiga derivadas de subunidades A de miembros de la familia de toxinas Shiga

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

Las regiones efectoras de la toxina Shiga de la invención pueden comprender o consistir esencialmente en un polipéptido derivado de una subunidad A de la toxina Shiga disociada de cualquier forma de su subunidad B de toxina Shiga nativa. Además, las proteínas citotóxicas de la presente invención pueden no comprender ningún polipéptido que comprende o que consiste esencialmente en un dominio de unión funcional de una subunidad B de toxina Shiga nativa. Más bien, las regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga están asociadas funcionalmente con regiones de unión de tipo inmunoglobulina heterólogas para efectuar el reconocimiento celular.

En ciertas realizaciones, una región efectora de la toxina Shiga de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, puede comprender o consistir en una subunidad A de la toxina Shiga de longitud completa SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2), o SLT-2A (SEQ ID NO: 3)), indicando que las subunidades A de la toxina Shiga natural pueden comprender formas precursoras que contienen secuencias de señal de aproximadamente 22 aminoácidos en sus extremos amino terminales que se eliminan para producir subunidades A de la toxina Shiga madura. En otras realizaciones, la región efectora de la toxina Shiga de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, comprende o consiste esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga truncada que es más corta que una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa.

Los truncamientos de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 son catalíticamente activos, capaces de inactivar los ribosomas enzimáticamente *in vitro*, y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). El fragmento de subunidad A de la toxina Shiga más pequeño que presenta actividad enzimática completa es un polipéptido compuesto de residuos 1-239 de SLT1A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque el fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que se indicó que retenía la actividad catalítica sustancial fueron los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)), un truncamiento de StxA expresado *de novo* dentro de una célula eucariota requiere sólo hasta el residuo 240 para alcanzar el citosol y ejercer la inactivación catalítica de ribosomas (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Las regiones efectoras de la toxina Shiga pueden comúnmente ser menores que la subunidad A de longitud completa. Se prefiere que la región efectora de la toxina Shiga mantenga la región de polipéptido desde la posición de aminoácido 77 a 239 (SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2)) o el equivalente en otras subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga. Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, las regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de SLT-1A pueden comprender o consistir en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID

NO: 1. De manera similar, las regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de StxA puede comprender o consistir en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 2, 1 a 241 de SEQ ID NO: 2, 1 a 251 de SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 2. Adicionalmente, las regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de SLT-2 pueden comprender o consistir en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 3, 1 a 241 de SEQ ID NO: 3, 1 a 251 del SEQ ID NO : 3, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 3.

La invención proporciona además variantes de las proteínas citotóxicas de la invención, en las que la región efectora de toxina Shiga difiere de una Subunidad A de toxina Shiga de origen natural en hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más residuos de aminoácidos (pero no más de los que retiene al menos 85%, 90%, 95%, 99% o más de identidad de la secuencia de aminoácidos). Por lo tanto, una región polipeptídica derivada de una Subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga puede comprender adiciones, deleciones, truncamientos u otras alteraciones de la secuencia original siempre que al menos 85%, 90%, 95%, 99% o más de identidad de la secuencia de aminoácidos se mantenga con una subunidad A de toxina Shiga de origen natural, tal como se define en las reivindicaciones.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% o 99,7% de identidad de secuencia global con SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-2A (SEQ ID NO: 3).

Opcionalmente, una versión de longitud total o truncada de la subunidad A de la toxina Shiga puede comprender una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones, inserciones o inversiones). Se prefiere, en ciertas realizaciones de la invención, que la región efectora de la toxina Shiga tenga suficiente identidad de secuencia con una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural para retener la citotoxicidad después de la entrada en una célula, ya sea por procedimientos bien conocidos de transformación, transfección, infección o inducción de la célula huésped, o mediante la internalización mediada mediante el reconocimiento de la región de unión de tipo inmunoglobulina unida con la región efectora de la toxina Shiga. Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades A de la toxina Shiga han sido asignadas a los siguientes posiciones de residuos: asparagina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170 y arginina-176 entre otras (Di, Toxicon 57: 525-39 (2011)). En cualquiera de las realizaciones de la invención, la región efectora de la toxina Shiga puede preferiblemente, pero no necesariamente, mantener uno o más aminoácidos conservados en las posiciones, tales como los que se encuentran en las posiciones 77, 167, 170, y 203 en StxA, SLT-1A o la posición conservada equivalente en otros miembros de la familia de toxinas Shiga que normalmente se requieren para la actividad citotóxica. La capacidad de una proteína citotóxica de la invención para causar la muerte celular, por ejemplo, su citotoxicidad, se puede medir utilizando uno cualquiera o más de una serie de ensayos bien conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones de la descripción, uno o más residuos de aminoácidos pueden mutarse o eliminarse con el fin de reducir o eliminar la actividad citotóxica de la región efectora de la toxina Shiga. La citotoxicidad de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede ser anulada o eliminada por mutación o truncamiento. Las posiciones marcadas como tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114 y triptófano-203 han demostrado ser importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1 y Stx2 (Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al., Biochemistry 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al., Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al., Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al., Microbiol Immunol 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)). La mutación del glutamato-167 y la arginina-170 eliminó la actividad enzimática de Slt-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas sin células (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque que utiliza la expresión *de novo* de Slt-I A1 en el retículo endoplásmico, la mutación de glutamato-167 y arginina-170 eliminó la citotoxicidad del fragmento de Slt-I A1 a ese nivel de expresión (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Un análisis de truncamiento demostró que un fragmento de StxA de los residuos 75 a 268 aún conserva una actividad enzimática significativa *in vitro* (Haddad, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)). Un fragmento truncado de Slt-I A1 que contiene los residuos 1-239 mostró actividad enzimática significativa *in vitro* y citotoxicidad mediante la expresión *de novo* en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). La expresión de un fragmento de Slt-I A1 truncado en los residuos 1-239 en el retículo endoplásmico no fue citotóxica porque no podía retrotranslocarse en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Para los fines de la presente invención, el orden o la orientación específica no es fijo para la región efectora de la toxina Shiga y la región de unión de tipo inmunoglobulina en relación la una con la otra o el extremo o extremos N-terminal o C-terminal de toda la proteína citotóxica (ver, por ejemplo, la Figura 1). En las proteínas citotóxicas anteriores, las regiones de unión de tipo inmunoglobulina y las regiones efectoras de toxina Shiga pueden estar directamente unidas entre sí y/o adecuadamente unidas entre sí a través de una o más secuencias de polipéptidos intermedios, tales como con uno o más conectores bien conocidos en la técnica.

#### Biomoléculas diana extracelulares

La región de unión de tipo inmunoglobulina de la proteína citotóxica de la invención comprende una región polipeptídica capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular, preferiblemente que está

físicamente acoplada a la superficie de un tipo de célula de interés, tal como una célula de cáncer, célula tumoral, célula plasmática, célula infectada, o célula huésped que alberga un patógeno intracelular.

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

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

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

Las regiones de unión de tipo inmunoglobulina de las proteínas citotóxicas de la invención pueden ser diseñadas o seleccionadas en base a numerosos criterios, tales como la expresión específica del tipo celular de sus biomoléculas diana y/o la localización física de sus biomoléculas diana con respecto a tipos de células específicas. Por ejemplo, ciertas proteínas citotóxicas de la presente invención comprenden dominios de unión de tipo inmunoglobulina capaces de unirse a dianas de superficie celular que son expresadas exclusivamente por solo un tipo de células en la superficie celular. Esto permite la eliminación selectiva de células de tipos de células específicos con una alta preferencia (al menos un efecto citotóxico triple) sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan la biomolécula diana extracelular. Alternativamente, la expresión de la biomolécula diana de la región de unión de tipo de inmunoglobulina puede no ser exclusiva de un tipo de célula si la biomolécula diana extracelular se expresa en cantidades suficientemente bajas y/o se acopla físicamente en cantidades bajas con tipos de células que no son dianas. Esto también permite la eliminación selectiva de células de tipos de células específicos con una alta preferencia (al menos un efecto citotóxico triple) sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana extracelular o que no están físicamente acopladas a una cantidad significativa de la biomolécula diana extracelular. Se puede eliminar una célula diana usando las proteínas citotóxicas de la invención en condiciones variadas de la célula, tales como células *ex vivo*, cultivadas *in vitro* o *in vivo*, incluidas las células *in situ* en sus ubicaciones nativas dentro de un organismo multicelular.

Las biomoléculas diana extracelulares de la región de unión de tipo inmunoglobulina de las proteínas citotóxicas de la invención de unión pueden incluir biomarcadores por encima de la proporción o exclusivamente presentes en las células cancerosas, células inmunes y las células infectadas con patógenos intracelulares, tales como virus, bacterias, hongos, priones o protozoos.

En ciertas realizaciones, se selecciona la región de unión de tipo inmunoglobulina para la unión específica y de alta afinidad a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde el antígeno está restringido en la expresión a las células cancerosas (véase Glokler J et al., *Molecules* 15: 2478-90 (2010); Liu Y et al., *Lab Chip* 9: 1033-6 (2009)). De acuerdo con otras realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina se selecciona para la unión específica y de alta afinidad a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde el antígeno se sobreexpresa o se expresa preferentemente por las células cancerosas en comparación con células no cancerosas. Algunas biomoléculas diana representativas incluyen, pero no se limitan a, las siguientes dianas enumeradas asociadas con cánceres y/o tipos específicos de células inmunes. Existen muchas regiones de unión de tipo inmunoglobulina que reconocen epítomos asociados con células cancerosas en la técnica anterior, tales como regiones de unión que reconocen a la proteína de antígeno de linfocitos B CD20 (CD20), CD22, CD25, CD30, CD40, CD79, CD248 (endosialina), CD33 (Siglec-3), CD52 (antígeno CAMPATH-1), proteína de antígeno carcinoembrionario (CEA), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB1), receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/Neu/ErbB2/CD340), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), receptor 2 de efrina tipo B (EphB2), proteínas de antígeno del virus de Epstein-Barr, proteína de antígeno de membrana específica de próstata (PSMA), endoglina (END/CD105), proteína de activación de fibroblastos

(FAP/seprasa) y receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) (ver Bagley R et al., Int J Oncol 34: 619-27 (2009)). Esta lista de biomoléculas diana pretende no ser limitativa. El experto en la materia entenderá que cualquier biomolécula diana deseada asociada con un tipo de célula cancerosa se puede usar para diseñar o seleccionar una región de unión de tipo inmunoglobulina para ser acoplada con la región efectora de toxina Shiga para producir una proteína citotóxica de la invención.

Los ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con las células cancerosas son proteína de antígeno de linfocitos B CD19 (CD19), CD21, CS1 (número 7 de la familia SLAM o SLAMF7), proteína de antígeno A33 de la superficie celular (gpA33), mucinas (tales como MUC1), glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), anhidrasa carbónica IX (CA9/CAIX), proteína de unión a folato (FBP), gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, integrinas alfa-V beta-3 ( $\alpha_v\beta_3$ ), integrinas alfa-5 beta-1 ( $\alpha_5\beta_1$ ), receptor proteína tirosina quinasa erB-3, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R), receptor 3 de efrina tipo A (EphA3), receptor de factor de necrosis tumoral 10A (TRAIL-R1/DR4), receptor de factor de necrosis tumoral 10B (TRAIL-R2), activador del receptor del factor nuclear kappa B (RANK), Tenascina C, proteínas Claudin (CLDN3, CLDN4), mesotelina (MSLN) y CD64 (FcγRI) (ver, Hough C et al., Cancer Res 60: 6281-7 (2000); Thepen T et al., Nat Biotechnol 18: 48-51 (2000); Pastan I et al., Nat Rev Cancer 6 : 559-65 (2006); Pastan, Ann u Rev Med 58: 221-37 (2007); Fitzgerald D et al., Cancer Res 71: 6300-9 (2011); Scott et al., Cancer Immun 12: 14-22 (2012)). Esta lista de biomoléculas diana pretende no ser limitativa.

Además, existen numerosos otros ejemplos de biomoléculas diana, tales como antígeno de melanoma reconocido por la proteína de las células T (MART-1/MelanA), proteína de melanocitos PMEL (gp100), tirosinasa, proteína 1 relacionada con tirosinasa (Trp 1), proteína 2 relacionada con tirosinasa (TRP-2), proteína 1 de antígeno asociada a melanoma (MAGE-1), antígeno 3 asociado a melanoma (MAGE-3), proteínas GAGE /PAGE, proteínas BAGE, proteínas de antígeno de melanoma expresado preferencialmente (PRAME), receptor para productos finales de glicación avanzada (RAGE), antígeno de cáncer de testículo NY-ESO-1, proteínas LAGE de antígeno de cáncer de testículo, lisofosfatidilglicerol aciltransferasa 1 (LPGAT1/IAA0205), proteínas SART, ADP-ribosiltransferasas (ART1, ART4), antígeno tumoral de Wilms, proteína de antígeno prostático específico (PSA), proteína de antígeno prostático de células madre (PSCA), aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa (HAAH) humana, receptor 2 de efrina tipo A (EphA2), receptor de proteína tirosina quinasa erbB-3, antígeno asociado a tirosinasa (TAA), proteínas de la región cluster de punto de ruptura-oncogén c-abl (BCR-ABL), proteína de antígeno de alfafetoproteína 17-A1, antígeno tumoral vesical (BTA), CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεRIa, galectina-9, mrp-14, siglec-8, siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD15, CD64, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, Galectina-3, CD11a-c, GITRL, MHC Clase II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282- TLR2 y CD123 (ver, Scott A et al., Cancer Immunity 12: 14 (2012); Cheever M et al., Clin Cancer Res 15: 5323-37 (2009), para biomoléculas diana y cabe indicar que las moléculas diana descritas ahí descritas son ejemplos no limitantes). El experto en la materia entenderá que se puede usar cualquier biomolécula diana deseada para diseñar o seleccionar una región de unión de tipo inmunoglobulina para ser acoplada con la región efectora de toxina Shiga para producir una proteína citotóxica de la invención.

## II Ejemplos de variaciones estructurales específicas de la proteína citotóxica

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, las proteínas citotóxicas comprenden la región efectora de toxina Shiga que comprende o que consiste en los aminoácidos 75 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2), o SLT-2A (SEQ ID NO: 3). Otras realizaciones son proteínas citotóxicas en las que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 241 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-2A (SEQ ID NO : 3). Otras realizaciones son proteínas citotóxicas en las que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 251 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-2A (SEQ ID NO : 3). Otras realizaciones son proteínas citotóxicas en las que la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 261 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-2A (SEQ ID NO : 3).

Para ciertas realizaciones de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende o consiste en los aminoácidos 269-508 de la SEQ ID NO: 4, que muestra la unión específica a CD38 humano con alta afinidad. Entre ciertas realizaciones de la presente invención, la región de unión del tipo de inmunoglobulina comprende o consiste en los aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 5, que muestra una unión específica a HER2 humano con alta afinidad.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ )" o "dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ )" se refieren respectivamente a cualquier dominio de anticuerpo  $V_H$  o  $V_L$  (por ejemplo, un dominio  $V_H$  o  $V_L$  humano), así como cualquier derivado de los mismos que retiene por lo menos la capacidad de unión a antígeno cualitativa del anticuerpo nativo correspondiente (por ejemplo un dominio  $V_H$  o  $V_L$  humanizado derivado de un dominio  $V_H$  o  $V_L$  murino nativo). Un dominio  $V_H$  o  $V_L$  consiste en una región "marco" interrumpida por las tres CDRs o ABRs. Las regiones marco sirven para alinear las CDR para la unión específica a un epítipo de un antígeno específico. Desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo terminal, ambos dominios  $V_H$  y

V<sub>L</sub> comprenden las siguientes regiones marco (FR) y regiones CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

Dentro del alcance de la presente descripción se encuentra el uso de fragmentos, variantes, y/o derivados de los polipéptidos de las proteínas citotóxicas de la invención que contienen un sitio de unión a biomolécula diana extracelular funcional, e incluso más preferiblemente capaces de unirse a la biomolécula diana con alta afinidad (por ejemplo, como se muestra por K<sub>D</sub>). Por ejemplo, la invención proporciona secuencias de polipéptidos que pueden unirse a CD38 y secuencias de polipéptidos que pueden unirse a HER2. Cualquier región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende un polipéptido se puede sustituir por esta región que se une a CD38 o HER2, expresados en la superficie celular, con una constante de disociación de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-12</sup> moles por litro, preferiblemente menos de 200 nM.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de una nanobody® o región derivada de inmunoglobulina de dominio único V<sub>HH</sub>. Generalmente, los nanoanticuerpos se construyen a partir de fragmentos de anticuerpos de dominio variable monomérico de origen natural (sdAbs) del tipo que se encuentran en los camélidos y peces cartilaginosos (Chondrichthyes). Los nanoanticuerpos se diseñan a partir de estos anticuerpos de origen natural truncando el dominio variable monomérico único para crear una molécula más pequeña y más estable. Debido a su pequeño tamaño, los nanoanticuerpos son capaces de unirse a los antígenos que no son accesibles a los anticuerpos enteros. Entre ciertas realizaciones de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina puede derivar de un nanobody® o región derivada de inmunoglobulina de dominio único V<sub>HH</sub> (por ejemplo, aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO: 5), que muestra una unión de alta afinidad específicamente a proteínas HER2 humanas.

### III. La función general de la proteína citotóxica

La presente invención proporciona varias proteínas citotóxicas para la eliminación selectiva de tipos de células específicas, comprendiendo las proteínas cada una 1) una región de unión de tipo inmunoglobulina para el reconocimiento celular, tal como se define en las reivindicaciones; y 2) una región efectora de toxina Shiga para la eliminación celular, tal como se define en las reivindicaciones. La unión de las regiones de unión del tipo de inmunoglobulina dirigida a las células con las regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga permite el diseño del reconocimiento específico del tipo de célula de la potente citotoxicidad o citostasis de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones, las proteínas citotóxicas de la presente invención son capaces de unir biomoléculas diana extracelulares asociadas con la superficie celular de tipos celulares particulares y entrar en esas células. Una vez internalizadas dentro de un tipo de célula diana, ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la presente invención son capaces de dirigir un fragmento de polipéptido efector de la toxina Shiga citotóxica al citosol de la célula diana. Una vez en el citosol de un tipo de célula diana, ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la invención son capaces de inactivar enzimáticamente los ribosomas y finalmente matar la célula. Este sistema es modular en el sentido de que se puede usar cualquier cantidad de diversas regiones de unión de tipo inmunoglobulina para dirigir esta potente citotoxicidad a varios tipos de células diversas y porque varias regiones efectoras derivadas de la subunidad A de toxina Shiga son potencialmente citotóxicas una vez dentro de una célula eucariota .

#### A. Muerte celular a través de la citotoxicidad dirigida de la toxina Shiga

Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para matar las células eucariotas, las proteínas citotóxicas diseñadas utilizando regiones efectoras de la toxina Shiga pueden mostrar una actividad de eliminación celular potente. Las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga comprenden dominios enzimáticos capaces de matar una célula eucariota una vez en el citosol de la célula. Ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la presente invención aprovechan este mecanismo citotóxico.

Tal como se define en las reivindicaciones, al ponerse en contacto una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina de una proteína citotóxica de la presente invención, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte de la célula. La eliminación celular puede lograrse usando una proteína citotóxica de la presente invención en condiciones variadas de células diana, tales como una célula diana manipulada *ex vivo*, una célula diana cultivada *in vitro*, una célula diana dentro de una muestra de tejido cultivada *in vitro* o una célula diana *in vivo*.

#### B. Citotoxicidad selectiva entre tipos de células.

Al dirigir al suministro de regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas usando regiones de unión de tipo de inmunoglobulina de alta afinidad a tipos de células específicas, esta potente actividad de eliminación de células puede restringirse a matar preferentemente los tipos de células seleccionados.

En ciertas realizaciones, tras la administración de la proteína citotóxica de la invención a una mezcla de tipos de células, la proteína citotóxica es capaz de eliminar selectivamente las células que se acoplan físicamente con una biomolécula diana extracelular en comparación con los tipos de células no acopladas físicamente con una

biomolécula diana extracelular. Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para eliminar células eucariotas, las proteínas citotóxicas diseñadas usando regiones efectoras de toxinas Shiga pueden mostrar una potente actividad citotóxica. Al dirigir el suministro de regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas a tipos de células específicas utilizando regiones de unión de tipo de inmunoglobulina de alta afinidad, esta potente actividad de eliminación de células puede restringirse a eliminar preferentemente solo aquellos tipos de células que desean ser reconocidos por su asociación física con una biomolécula diana de las regiones de unión de tipo inmunoglobulina elegidas.

En ciertas realizaciones, la proteína citotóxica de la invención es capaz de causar selectivamente o preferencialmente la muerte de un tipo celular específico dentro de una mezcla de dos o más tipos diferentes de células. Esto permite la actividad citotóxica dirigida a tipos de células específicos con una alta preferencia, tal como un efecto citotóxico triple, sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan la biomolécula diana. Alternativamente, la expresión de la biomolécula diana de la región de unión del tipo de inmunoglobulina puede no ser exclusiva de un tipo de célula si la biomolécula diana se expresa en cantidades suficientemente bajas y/o se acopla físicamente en cantidades bajas con tipos de células que no deben reconocerse. Esto permite la eliminación selectiva de tipos de células específicos con una alta preferencia, tal como un efecto citotóxico triple, sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana o que no están físicamente acopladas a cantidades significativas de la biomolécula diana.

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

En ciertas realizaciones, la actividad citotóxica hacia poblaciones de tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular es al menos 3 veces mayor que la actividad citotóxica hacia las poblaciones de tipos de células no acopladas físicamente con cualquier biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina. Según la presente invención, la citotoxicidad selectiva puede ser cuantificada en términos de la relación (a/b) de (a) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo celular específico acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión a (b) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo celular no acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la relación de citotoxicidad es indicativa de la citotoxicidad selectiva que es al menos 3 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 250 veces, 500 veces, 750 veces, 1000 veces, o más alta para las poblaciones de células o tipos de células acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión de tipo inmunoglobulina en comparación con poblaciones de células o tipos de células no acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión de tipo inmunoglobulina.

Esta función de eliminación celular preferencial permite eliminar una célula diana por ciertas proteínas citotóxicas de la invención bajo condiciones variadas y en presencia de células espectadoras no reconocidas, tales como mezclas manipuladas *ex vivo* de tipos de células, tejidos cultivados *in vitro* con mezclas de tipos de células, o *in vivo* en presencia de múltiples tipos de células (por ejemplo, *in situ* o en una ubicación nativa dentro de un organismo multicelular).

Además, las formas catalíticamente inactivas de las proteínas citotóxicas de la invención opcionalmente pueden usarse para funciones de diagnóstico. La conjugación de agentes de diagnóstico adicionales conocidos en la técnica con proteínas citotóxicas de la invención puede permitir la obtención de imágenes de orgánulos intracelulares (por ejemplo, Golgi, retículo endoplásmico y compartimentos citosólicos) de células cancerosas individuales, células inmunitarias o células infectadas por microbios en un paciente o muestra de biopsia. Por ejemplo, esto puede ser útil para diagnosticar tipos de células neoplásicas, evaluar la progresión de las terapias contra el cáncer a lo largo del tiempo y/o evaluar la presencia de células cancerosas residuales después de la escisión quirúrgica de una masa tumoral.

#### Variaciones en la secuencia de polipéptidos de la proteína citotóxica que mantienen la estructura y función general

En algunas de las realizaciones anteriores, la proteína citotóxica de la invención es una variante en la que hay una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos introducidos en la región o regiones del polipéptido. Tal como se usa en el presente documento, el término "sustitución conservadora" indica que uno o más aminoácidos son reemplazados por otro residuo de aminoácido biológicamente similar. Los ejemplos incluyen la sustitución de residuos de aminoácidos con características similares, por ejemplo, aminoácidos pequeños, aminoácidos ácidos, aminoácidos polares, aminoácidos básicos, aminoácidos hidrófobos y aminoácidos aromáticos (véase, por ejemplo, la Tabla B a continuación). Un ejemplo de una sustitución conservadora con un residuo que normalmente no se encuentra en péptidos y proteínas endógenos de mamíferos es la sustitución conservadora de un residuo de arginina o lisina por, por ejemplo, ornitina, canavanina, aminoetilcisteína u otro aminoácido básico. Para obtener más

información sobre las sustituciones fenotípicamente silenciosas en péptidos y proteínas (véase, por ejemplo, Bowie J et al., Science 247: 1306-10 (1990)). En el siguiente esquema se encuentran sustituciones conservadoras de aminoácidos agrupados por propiedades fisicoquímicas. I: neutros, hidrófilos, II: ácidos y amidas, III: básicos, IV: hidrófobos, V: aminoácidos aromáticos y voluminosos.

5

TABLA B. Ejemplos de sustituciones conservadoras de aminoácidos

I	II	III	IV	V
A	N	H	M	F
S	D	R	L	Y
T	E	K	I	W
P	Q		V	
G			C	

10 En ciertas realizaciones, tal como se define en las reivindicaciones, una proteína citotóxica de la invención puede comprender fragmentos o variantes funcionales de una región de polipéptido de la invención que tiene, como máximo, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 sustituciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de polipéptidos mencionada en la presente memoria, siempre que retenga actividad biológica medible sola o como un componente de una proteína citotóxica. Tal como se define en las reivindicaciones, las variantes de proteínas citotóxicas están dentro del alcance de la invención como resultado de cambiar un polipéptido de la proteína citotóxica alterando uno o más aminoácidos o eliminando o insertando uno o más aminoácidos, tal como dentro de la región de unión de tipo inmunoglobulina o la región efectora de toxina Shiga, para lograr las propiedades deseadas, tales como citotoxicidad cambiada, efectos citostáticos cambiados, inmunogenicidad cambiada y/o semivida en suero cambiada. Un polipéptido de una proteína citotóxica de la invención puede estar además con o sin una secuencia señal.

20 En ciertas realizaciones, una proteína citotóxica de la invención comparte al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más identidad de secuencia de aminoácidos con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de una proteína citotóxica mencionada en el presente documento, siempre que retenga actividad biológica medible, tal como citotoxicidad, unión a biomolécula diana extracelular, catálisis enzimática o enrutamiento subcelular. La región de unión de tipo inmunoglobulina puede diferir de las secuencias de aminoácidos de una proteína citotóxica mencionada en el presente documento, siempre que conserve la funcionalidad de unión a su biomolécula diana extracelular. La funcionalidad de unión probablemente se retendrá si las secuencias de aminoácidos de las CDR o ABR son idénticas. Por ejemplo, una proteína citotóxica está dentro del alcance de la reivindicación que consiste esencialmente en un 85% de identidad de aminoácidos con una proteína citotóxica mencionada en el presente documento que, a los efectos de determinar el grado de identidad de aminoácidos, los residuos de aminoácidos que forman las CDR o ABR son ignorados. La funcionalidad de unión se puede determinar por un experto utilizando técnicas estándar.

35 En ciertas realizaciones, la región efectora de la toxina Shiga puede alterarse para cambiar la actividad enzimática de la región efectora de la toxina Shiga, al tiempo que conserva una actividad citotóxica, tal como se define en las reivindicaciones. Las posibles alteraciones incluyen mutaciones en la región del efecto de la toxina Shiga seleccionada del grupo que consiste en: eliminación y sustitución de residuos de aminoácidos.

40 La citotoxicidad de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede ser anulada o eliminada por mutación o truncamiento. Las posiciones marcadas como tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114 y triptófano-203 han demostrado ser importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1 y Stx2 (Hovde C et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al., Biochemistry 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al., Mol Gen Genet 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al., Microb Pathog 15: 169-76 (1993); Cao C et al., Microbiol Immunol 38: 441-7 (1994); Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)). La mutación del glutamato-167 y la arginina-170 eliminó la actividad enzimática de Slt-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas sin células (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque que utiliza la expresión *de novo* de Slt-I A1 en el retículo endoplásmico, la mutación de glutamato-167 y arginina-170 eliminó la citotoxicidad del fragmento Slt-I A1 a ese nivel de expresión (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Un análisis de truncamiento demostró que un fragmento de StxA de los residuos 75 a 268 aún conserva una actividad enzimática significativa *in vitro* (Haddad, J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)). Un fragmento truncado de Slt-I A1 que contiene los residuos 1-239 mostró actividad enzimática significativa *in vitro* y citotoxicidad por la expresión *de novo* en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). La expresión de un fragmento Slt-I A1 truncado en los residuos 1-239 en el retículo endoplásmico no fue citotóxica porque no pudo volver a traslocarse en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

55 Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades A de toxina Shiga fueron asignadas a las siguientes posiciones de residuos: asparagina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, y la arginina-176, entre otros (Di, Toxicon 57: 535-39 (2011)). En particular, una construcción de doble mutante de Stx2A que contiene mutaciones de glutamato-E167-a-lisina y arginina-176-a-lisina fue completamente

inactivada; mientras que muchas mutaciones individuales en Stx1 y Stx2 mostraron una reducción de 10 veces en la citotoxicidad. Además, el truncamiento de Stx1A a 1-239 o 1-240 redujo su citotoxicidad, y de manera similar, el truncamiento de Stx2A a un residuo hidrofóbico conservado redujo su citotoxicidad.

5 Los truncamientos de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 son catalíticamente activos, capaces de inactivar enzimáticamente los ribosomas *in vitro*, y citotóxicos cuando se expresan dentro de una célula (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). El fragmento de subunidad A de toxina Shiga más pequeño que exhibe actividad enzimática completa es un polipéptido compuesto por los residuos 1-239 de Stx1A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque el fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que demostró retener  
10 una actividad catalítica sustancial fueron los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994)), un truncamiento de StxA expresado *de novo* dentro de una célula eucariota requiere solo hasta el residuo 240 para alcanzar el citosol y ejercer la inactivación catalítica de los ribosomas (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

15 En ciertas realizaciones de la descripción derivada de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2), estos cambios incluyen la sustitución de la asparagina en la posición 75, tirosina en la posición 77, tirosina en la posición 114, glutamato en la posición 167, arginina en la posición 170, arginina en la posición 176, y/o sustitución del triptófano en la posición 203. El experto en la materia conocerá ejemplos de tales sustituciones según la técnica anterior, tal como asparagina en la posición 75 a alanina, tirosina en la posición 77 a serina, sustitución de la tirosina en la posición 114 a alanina, sustitución del glutamato en la posición 167 a aspartato, sustitución de la arginina en la  
20 posición 170 a alanina, subestación de la arginina en la posición 176 a lisina, y/o sustitución del triptófano en la posición 203 a alanina.

25 Las proteínas citotóxicas como se definen en las reivindicaciones de la invención pueden conjugarse opcionalmente con uno o más agentes adicionales que pueden incluir agentes terapéuticos y/o diagnósticos conocidos en la técnica.

#### Producción, fabricación, y purificación de una proteína citotóxica

30 Las proteínas citotóxicas de la presente invención pueden ser producidas utilizando técnicas de ingeniería bioquímica bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas citotóxicas de la invención pueden fabricarse mediante procedimientos estándar de síntesis, mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. De este modo, las proteínas citotóxicas pueden sintetizarse de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, procedimientos que comprenden: (1) sintetizar un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína citotóxica usando la metodología de fase sólida o fase  
35 líquida estándar, ya sea por pasos o por ensamblaje del fragmento, y aislar y purificar el producto del compuesto peptídico final; (2) expresar un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína citotóxica en una célula huésped y recuperar el producto de expresión de la célula huésped o cultivo de células huésped; o (3) expresión *in vitro* libre de células de un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína citotóxica, y recuperar el producto de expresión; o mediante cualquier  
40 combinación de los procedimientos (1), (2) o (3) para obtener fragmentos del componente peptídico, uniendo posteriormente (por ejemplo, ligando) los fragmentos para obtener el componente de péptido, y recuperar el componente peptídico.

45 Puede ser preferible sintetizar un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína citotóxica de la presente invención por medio de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase líquida. Las proteínas citotóxicas de la invención pueden fabricarse convenientemente mediante procedimientos sintéticos estándar. Así, los péptidos se pueden sintetizar mediante procedimientos, por ejemplo, que comprenden sintetizar el péptido mediante metodología de fase sólida o fase líquida estándar, ya sea paso a paso o mediante el ensamblaje del fragmento, y aislar y purificar el producto peptídico final. En este contexto, puede hacerse referencia a WO 1998/11125 o, entre  
50 otros, Fields G et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis (Synthetic Peptides, Grant G, ed., Oxford University Press, Reino Unido, segunda ed., 2002) y los ejemplos de síntesis en los mismos.

55 Las proteínas citotóxicas de la presente invención se pueden preparar (producir y purificar) usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. En general, se describen procedimientos para preparar polipéptidos mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que comprende el polinucleótido codificante y recuperar el polipéptido del cultivo de células, por ejemplo, en Sambrook J et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (Press, NY, Estados Unidos, 1989); Dieffenbach C et al, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., 1995). Cualquier célula huésped adecuada puede utilizarse para producir una proteína citotóxica de la invención. Las células huésped  
60 pueden ser células transfectadas, transformadas, transducidas o infectadas de forma estable o transitoria, con uno o más vectores de expresión que dirigen la expresión de un polipéptido de la invención. Además, una proteína citotóxica de la invención se puede producir mediante la modificación del polinucleótido que codifica la proteína citotóxica, lo que da lugar a la alteración de uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos con el fin de conseguir las propiedades deseadas, tales como cambio de citotoxicidad, cambio de efectos citostáticos, cambio de inmunogenicidad, y/o cambio de semivida en suero.  
65



Por consiguiente, la presente descripción también proporciona procedimientos para producir una proteína citotóxica de la invención de acuerdo con los procedimientos anteriormente citados y el uso de un polinucleótido que codifica una parte o la totalidad de un polipéptido de la invención, un vector de expresión que comprende al menos un polinucleótido de la invención capaz de codificar parte o la totalidad de un polipéptido de la invención cuando se introduce en una célula huésped y/o una célula huésped que comprende un polinucleótido o vector de expresión de la invención.

Cuando un polipéptido o proteína se expresa utilizando técnicas recombinantes en una célula huésped o sistema libre de células, es ventajoso separar (o purificar) el polipéptido o proteína deseado de otros componentes, tales como factores de la célula huésped, con el fin de obtener preparaciones que sean de alta pureza o sean sustancialmente homogéneas. La purificación se puede lograr mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como técnicas de centrifugación, técnicas de extracción, cromatografía y técnicas de fraccionamiento (por ejemplo, separación por tamaño mediante filtración en gel, separación de cargas mediante columna de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía en sílice o resinas de intercambio catiónico, tales como DEAE, cromatografía de exclusión, y cromatografía con proteína A Sepharose para eliminar los contaminantes), y técnicas de precipitación (por ejemplo precipitación con etanol o precipitación con sulfato de amonio). Se puede utilizar cualquier cantidad de técnicas de purificación bioquímica para aumentar la pureza de una proteína citotóxica de la invención. En ciertas realizaciones, las proteínas citotóxicas de la invención opcionalmente se pueden purificar en formas homomultiméricas (es decir, un complejo de proteínas de dos o más proteínas citotóxicas).

En los ejemplos a continuación se encuentran descripciones de ejemplos no limitantes de procedimientos para producir una proteína citotóxica de la invención, así como aspectos específicos, pero no limitantes, de la producción de proteína citotóxica para las proteínas citotóxicas, de ejemplo, descritas.

#### Composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína citotóxica

La presente invención proporciona proteínas citotóxicas para usar, solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en una composición farmacéutica, para el tratamiento o la profilaxis de afecciones, enfermedades, trastornos o síntomas descritos en más detalle a continuación (por ejemplo, cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, trastornos inmunitarios e infecciones microbianas). La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína citotóxica de la invención, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la misma, según la presente invención, junto con al menos un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención puede comprender formas homomultiméricas y/o heteromultiméricas de las proteínas citotóxicas de la invención. Las composiciones farmacéuticas serán útiles en procedimientos de tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad, afección, trastorno o síntoma que se describe en más detalle a continuación. Cada una de dicha enfermedad, afección, trastorno o síntoma se prevé que es una realización separada con respecto a los usos de una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La invención proporciona además composiciones farmacéuticas para usar en al menos un procedimiento de tratamiento, tal como se define en las reivindicaciones, tal como se describe en más detalle a continuación.

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

Tal como se usa en el presente documento, "tratar", "que trata" o "tratamiento" y las variantes gramaticales de los mismos se refieren a una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los términos pueden referirse a retardar la aparición o la velocidad de desarrollo de una afección, trastorno o enfermedad, reducir o aliviar los síntomas asociados con los mismos, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de cualquiera de los anteriores. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, la reducción o alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (por ejemplo, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratar", "que trata" o "tratamiento" también pueden significar prolongar la supervivencia en relación con el tiempo de supervivencia esperado si no se recibe tratamiento. Un sujeto (por ejemplo un ser humano) en necesidad de tratamiento puede ser, por tanto, un sujeto ya aquejado de la enfermedad o trastorno en cuestión. Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" incluyen la inhibición o la reducción de un aumento en la gravedad de un estado o síntomas patológicos con respecto a la ausencia de tratamiento, y no está necesariamente destinado a implicar el cese completo de la enfermedad, trastorno o estado pertinentes.

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

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

#### Producción o fabricación de una composición farmacéutica que comprende una proteína citotóxica

Sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las proteínas citotóxicas de la presente invención igualmente están dentro del alcance de la presente invención.

El término "solvato" en el contexto de la presente invención se refiere a un complejo de estequiometría definida formado entre un soluto (en este caso, una molécula de la invención o sal farmacéuticamente aceptable de la misma de acuerdo con la invención) y un disolvente. El disolvente en esta conexión puede, por ejemplo, ser agua, etanol u otra especie orgánica farmacéuticamente aceptable, típicamente de peso molecular pequeño, tal como, pero no limitado a, ácido acético o ácido láctico. Cuando el disolvente en cuestión es agua, un solvato de este tipo se conoce normalmente como un hidrato.

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

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

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico. También puede ser deseable la inclusión de agentes isotónicos, tales como azúcares, o cloruro de sodio, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

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

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una o una combinación de diferentes proteínas citotóxicas de la invención, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

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

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

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

Cuando se diseña una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína citotóxica de la invención para ser administrada mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en forma de una solución acuosa libre de pirógenos parenteralmente aceptable. Los procedimientos para preparar soluciones de proteína parenteralmente aceptables, teniendo en consideración un pH, isotonicidad, estabilidad, y

similares apropiados están dentro de la experiencia en la técnica. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea contiene, además de agentes de unión, un vehículo isotónico, tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro sódico, inyección de Ringer con lactato, u otro vehículo conocido en la técnica. Una composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes, u otros aditivos bien conocidos por los expertos en la técnica.

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

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse para asegurar una distribución deseada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica excluye muchos compuestos grandes y/o hidrófilos. Para direccionar un compuesto terapéutico o composición de la invención a una localización particular *in vivo*, se pueden formular, por ejemplo, en liposomas que pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente en células u órganos específicos, mejorando así la administración dirigida de fármacos. Los restos de direccionamiento de ejemplo incluyen folato o biotina; manósidos; anticuerpos; receptor de la proteína A surfactante; y p120 catenina.

#### Polinucleótidos, vectores de expresión y células huésped

Más allá de las proteínas citotóxicas de la presente invención, los polinucleótidos que codifican tales proteínas citotóxicas están dentro del alcance de la presente invención. El término "polinucleótido" es equivalente a la expresión "ácidos nucleicos", incluyendo ambos polímeros de ácidos desoxirribonucleicos (ADN), polímeros de ácidos ribonucleicos (ARN), análogos de estos ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos, y derivados, fragmentos y homólogos de los mismos. El polinucleótido de la invención puede ser de cadena simple, doble o de cadena triple. Los polinucleótidos descritos se dan a conocer específicamente para incluir todos los polinucleótidos que codifican una proteína citotóxica de ejemplo, por ejemplo, teniendo en cuenta la oscilación conocida para ser tolerada en la tercera posición de los codones de ARN, aunque codifican el mismo aminoácido como un codón diferente de ARN.

En un aspecto, la invención proporciona un polinucleótido que codifica una proteína citotóxica de la invención, o un complemento de la misma, tal como se define en las reivindicaciones. Los polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o más, idéntico a un polipéptido que comprende una de las secuencias de aminoácidos de la proteína citotóxica. La descripción también incluye polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que codifica una proteína citotóxica de la invención, o un fragmento o derivado de la misma, o la antisentido o complemento de cualquiera de tales secuencias.

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

La presente invención proporciona adicionalmente vectores de expresión que comprende los polinucleótidos dentro del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. Los polinucleótidos capaces de codificar las proteínas citotóxicas de la invención pueden insertarse en vectores conocidos, incluyendo plásmidos bacterianos, vectores virales y vectores de fago, utilizando materiales y procedimientos bien conocidos en la técnica para producir vectores de expresión. Tales vectores de expresión incluirán los polinucleótidos necesarios para apoyar la producción de las proteínas citotóxicas contempladas dentro de cualquier célula huésped de los sistemas de expresión de elección o libre de células (por ejemplo pTxb1 y pIVEX2.3 descritos en los Ejemplos a

continuación). Los polinucleótidos específicos que comprenden los vectores de expresión para su uso con tipos de células específicas huésped o sistemas de expresión libres de células son bien conocidos para una persona de experiencia ordinaria en la técnica, pueden determinarse utilizando experimentación de rutina, o pueden adquirirse.

5 El término "vector de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido, lineal o circular, que comprende una o más unidades de expresión. El término "unidad de expresión" se refiere a un segmento de polinucleótido que codifica un polipéptido de interés y es capaz de proporcionar la expresión del  
10 segmento de ácido nucleico en una célula huésped. Una unidad de expresión comprende típicamente un promotor de transcripción, un marco de lectura abierto que codifica el polipéptido de interés, y un terminador de la transcripción, todos en configuración operativa. Un vector de expresión contiene una o más unidades de expresión. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, un vector de expresión que codifica una proteína  
15 citotóxica que comprende una cadena de polipéptido única (por ejemplo, un scFv genéticamente recombinado con una región efectora de la toxina Shiga) incluye al menos una unidad de expresión para la cadena de polipéptido única, mientras que una proteína citotóxica que comprende, por ejemplo, dos o más cadenas de polipéptidos (por ejemplo, una cadena que comprende un dominio  $V_L$  y una segunda cadena que comprende un dominio  $V_H$  unido a una región efectora de la toxina) incluye al menos dos unidades de expresión, una para cada una de las dos cadenas de polipéptido de la proteína. Para la expresión de proteínas citotóxicas de múltiples cadenas, una unidad de expresión para cada cadena de polipéptido también puede estar contenida por separado en diferentes vectores de expresión (por ejemplo, la expresión puede conseguirse con una única célula huésped en la que se han  
20 introducido vectores de expresión para cada cadena de polipéptido).

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

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

35 Las proteínas citotóxicas dentro del alcance de la presente invención pueden ser variantes o derivados de las proteínas citotóxicas descritas en el presente documento que son producidas por la modificación del polinucleótido que codifica una proteína citotóxica mediante la alteración de uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos que pueden hacerlas más adecuadas para lograr las propiedades deseadas, tales como la expresión más óptima por una célula huésped.

#### 40 Procedimientos para usar una proteína citotóxica o una composición farmacéutica de la misma

Generalmente, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes farmacológicamente activos, así como composiciones que los comprendan, que puedan usarse en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones, tales como ciertos tipos de cáncer, tumores, trastornos inmunes o afecciones patológicas adicionales mencionadas en este documento. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para usar las proteínas citotóxicas de la invención para la eliminación de células y también proporciona el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones, tal como se describe en el presente documento.

50 En particular, es un objeto de la presente invención proporcionar tales agentes farmacológicamente activos, composiciones y/o procedimientos que tienen ciertas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o procedimientos que se conocen actualmente en la técnica. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos, tal como se definen en las reivindicaciones, de uso de proteínas citotóxicas con secuencias de polipéptidos especificadas y composiciones farmacéuticas de las mismas. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias de polipéptidos en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5 se puede utilizar específicamente como un componente de la proteína citotóxica utilizada en los siguientes procedimientos.

La presente invención proporciona procedimientos *in vitro* para eliminar una célula que comprende la etapa de poner en contacto la célula con una proteína citotóxica de la presente invención, tal como se define en las  
60 reivindicaciones. Las proteínas citotóxicas y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para eliminar un tipo de célula específica tras el contacto de una célula o células con una de las composiciones de materia reivindicadas. En ciertas realizaciones, una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para eliminar tipos de células específicas en una mezcla de diferentes tipos de células, tales como mezclas que comprenden células cancerosas, células infectadas y/o células hematológicas. En ciertas realizaciones, una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para  
65

eliminar células cancerosas en una mezcla de diferentes tipos de células. En ciertas realizaciones, una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para eliminar tipos de células específicas en una mezcla de diferentes tipos de células, tales como tejidos pretrasplante. En ciertas realizaciones, una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para eliminar tipos de células específicas en una mezcla de tipos de células, tales como material de tejido de preadministración con fines terapéuticos. En ciertas realizaciones, una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para eliminar selectivamente las células infectadas por virus o microorganismos, o en cualquier caso, eliminar selectivamente células que expresan una biomolécula diana extracelular particular, tal como una biomolécula de la superficie celular. Las proteínas citotóxicas y composiciones farmacéuticas de la invención tienen diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, usos en el agotamiento de tipos de células no deseadas de tejidos, ya sea *in vitro* o *in vivo*, usos en la modulación de la respuesta inmunitaria para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, uso como agentes antivirales, usos como agentes antiparasitarios y usos en la purga de tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas.

En ciertas realizaciones, una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención, solas o en combinación con otros compuestos o composiciones farmacéuticas, pueden mostrar una potente actividad de eliminación de células cuando se administran a una población de células, *in vitro* o *in vivo*, en un sujeto, tal como en un paciente en necesidad de tratamiento. Al dirigir la liberación de las regiones de la toxina Shiga enzimáticamente activas utilizando regiones de unión de tipo inmunoglobulina de alta afinidad a tipos de células de cáncer, esta potente actividad de eliminación de células puede restringirse para eliminar específica y selectivamente ciertos tipos de células dentro de un organismo, tales como ciertas células cancerosas, células neoplásicas, células malignas, células tumorales no malignas, o células infectadas.

La presente descripción proporciona un procedimiento para eliminar una célula en un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente al menos una proteína citotóxica de la presente invención o una composición farmacéutica de la misma.

Ciertas realizaciones de la proteína citotóxica o composiciones farmacéuticas de la misma se pueden utilizar para eliminar una célula de cáncer en un paciente mediante el reconocimiento de una biomolécula extracelular que se encuentra acoplada físicamente con una célula de cáncer y/o tumoral. Los términos "célula de cáncer" o "célula cancerosa" se refieren a diversas células neoplásicas que crecen y se dividen de una forma anormalmente acelerada y estará claras para la persona experta. El término cancerosa incluye tanto las células malignas como no malignas. En general, los cánceres y/o tumores se pueden definir como enfermedades, trastornos o afecciones que son susceptibles de tratamiento y/o prevención. Los cánceres y tumores (ya sea malignos o no malignos) que se componen de células de cáncer y/o células tumorales serán evidentes para el experto.

Ciertas realizaciones de la proteína citotóxica o composiciones farmacéuticas de la misma pueden usarse para eliminar una célula inmunitaria (ya sea sana o maligna) en un paciente reconociendo una biomolécula extracelular encontrada físicamente acoplada con una célula inmunitaria.

Ciertas realizaciones de la proteína citotóxica o composiciones farmacéuticas de la misma pueden usarse para eliminar una célula infectada en un paciente reconociendo una biomolécula extracelular que se encuentra físicamente acoplada con una célula infectada.

Está dentro del alcance de la presente invención utilizar la proteína citotóxica de la invención o la composición farmacéutica de la misma con el propósito del agotamiento *ex vivo* de células T de las poblaciones de células aisladas eliminadas de un paciente. En un ejemplo no limitante, la proteína citotóxica se puede usar en un procedimiento para la profilaxis del rechazo del trasplante de órganos en el que el órgano donante se perfunde antes del trasplante con la proteína citotóxica de la invención o una composición farmacéutica de la misma para purgar el órgano de células T donantes.

También está dentro del alcance de la presente invención utilizar la proteína citotóxica de la invención o la composición farmacéutica de la misma con el propósito de purgar poblaciones de células de pacientes (por ejemplo, médula ósea) de células malignas, neoplásicas o, en cualquier caso células T no deseadas, y a continuación reperfundir el material agotado de células T en el paciente.

También está dentro del alcance de la presente invención utilizar la proteína citotóxica de la invención o la composición farmacéutica de la misma con el propósito de agotar las células T de una población de células donantes como una profilaxis contra la enfermedad del injerto contra el huésped, y la inducción de tolerancia, en un paciente que se va a someter a un trasplante de médula ósea o de células madre.

Ciertas realizaciones de la proteína citotóxica o composiciones farmacéuticas de la misma pueden usarse para eliminar una célula infectada en un paciente reconociendo una biomolécula extracelular que se encuentra físicamente acoplada con una célula infectada.

Adicionalmente, la presente descripción proporciona un procedimiento de tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que comprende la etapa de administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una de las proteínas citotóxicas de la presente invención o una composición farmacéutica de las mismas. Las enfermedades, trastornos y afecciones contempladas que se pueden tratar utilizando este procedimiento incluyen cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas. La administración de una "dosis terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención puede dar lugar a una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido al sufrimiento por la enfermedad.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, el tipo de mamífero a tratar y las características físicas del paciente específico bajo consideración. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas. Esta cantidad y el procedimiento de administración pueden adaptarse para conseguir una eficacia óptima y pueden depender de factores, tales como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores bien conocidos por los expertos en las técnicas médicas. El régimen de dosificación y el tamaño de dosificación más apropiados para uso humano pueden estar dirigidos por los resultados obtenidos por la presente invención, y se pueden confirmar en ensayos clínicos diseñados adecuadamente. Se puede determinar un protocolo de dosificación y tratamiento eficaz mediante medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y a continuación aumentando la dosis, mientras se monitorizan los efectos, y variando sistemáticamente el régimen de dosificación también. Un médico puede tomar en consideración numerosos factores cuando se determina una dosis óptima para un sujeto determinado. Estas consideraciones son conocidas para el experto.

Una vía de administración aceptable puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, aerosol, enteral, nasal, oftálmica, oral, parenteral, rectal, vaginal o transdérmica (por ejemplo, la administración tópica de una crema, gel o pomada, o por medio de un parche transdérmico). "Administración parenteral" se asocia típicamente con inyección en un sitio de acción deseado o en comunicación con el mismo, incluyendo administración inyección intratumoral, intraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosal o transtraqueal.

Para la administración de una composición farmacéutica de la invención, el intervalo de dosis será generalmente de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más normalmente de 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal del huésped. Las dosificaciones de ejemplo pueden ser 0,25 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo es una administración una vez o dos veces al día, o una administración una o dos veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada dos o tres meses o una vez cada tres a 6 meses. Las dosificaciones pueden seleccionarse y reajustarse por el profesional experto de la salud según se requiera para maximizar el beneficio terapéutico para un paciente particular.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se administrarán habitualmente al mismo paciente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, 2-5 días, semanas, meses, cada dos o tres meses, cada seis meses o cada año. Los intervalos entre administraciones también pueden ser irregulares, basándose en la regulación de los niveles en sangre u otros marcadores en el sujeto o paciente. Los regímenes de dosificación para un compuesto de la presente invención incluyen la administración intravenosa de 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal con el compuesto administrado cada dos a cuatro semanas durante seis dosis, a continuación, cada tres meses a 3 mg/kg de peso corporal o 1 mg/kg de peso corporal.

Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a través de una o más vías de administración, utilizando una o más de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Tal como se entenderá por el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración para las proteínas citotóxicas o composiciones farmacéuticas de la invención incluyen, por ejemplo, administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión en o en comunicación con el sitio de acción pretendido (por ejemplo, inyección intratumoral). En otras realizaciones, una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la invención pueden administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o por mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual, o tópica.

Las proteínas citotóxicas terapéuticas o composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar con una o más de una variedad de dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención están en la técnica, incluyendo, por ejemplo, bombas de microinfusión implantables para la liberación a velocidad

controlada; dispositivos para la administración a través de la piel; bombas de infusión para la liberación a una velocidad de infusión precisa; dispositivos de infusión implantables de flujo variable para la administración continua de fármacos; y sistemas de administración osmótica de fármacos. Estos y otros implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

5 Una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Una terapia de combinación puede incluir una proteína citotóxica de la invención o composición farmacéutica de la misma en combinación con al menos otro agente terapéutico seleccionado en base al paciente en particular, la enfermedad o afección a ser tratada. Ejemplos de dichos otros agentes incluyen, entre otros, un agente anticáncer o quimioterapéutico citotóxico, un agente antiinflamatorio o antiproliferativo, un agente antimicrobiano o antiviral, factores de crecimiento, citoquinas, un analgésico, una molécula o polipéptido pequeño terapéuticamente activo, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo clásico o fragmento del mismo, o una molécula de ácido nucleico que modula una o más vías de señalización, y agentes terapéuticos de modulación similares que pueden complementar o, en cualquier caso, ser beneficiosos en un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico.

10 El tratamiento de un paciente con una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la invención conduce preferiblemente a la muerte celular de las células diana y/o la inhibición del crecimiento de células diana. Por tanto, las proteínas citotóxicas de la invención, y composiciones farmacéuticas que las comprenden serán útiles en procedimientos para tratar una variedad de trastornos patológicos en los que eliminar o agotar las células diana puede ser beneficioso, tales como, entre otros, cánceres, trastornos inmunitarios y células infectadas. La presente descripción proporciona procedimientos para la supresión de la proliferación celular y el tratamiento de trastornos de células, incluyendo neoplasia, células B hiperactivas y células T hiperactivas.

15 En ciertas realizaciones, las proteínas citotóxicas y composiciones farmacéuticas de la invención se pueden usar para tratar o prevenir cánceres, tumores (malignos y no malignos), trastornos del sistema inmunitario e infecciones microbianas. En un aspecto adicional, el procedimiento anterior *ex vivo* puede combinarse con el procedimiento *in vivo* anterior para el tratamiento o prevención del rechazo en receptores de trasplante de médula ósea, y para conseguir tolerancia inmunológica.

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

25 Las proteínas citotóxicas y composiciones farmacéuticas de la invención tienen diversas aplicaciones, incluyendo, por ejemplo, usos en la eliminación de las células T no deseadas, usos en la modulación de las respuestas inmunitarias para tratar enfermedades de injerto frente a huésped, usos como agentes antivirales, usos como agentes antimicrobianos y usos en la purga de tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas. Las proteínas citotóxicas y composiciones farmacéuticas de la presente invención son comúnmente agentes antineoplásicos, lo que significa que son capaces de tratar y/o prevenir el desarrollo, la maduración o la propagación de células neoplásicas o malignas al inhibir el crecimiento y/o causar la muerte de cáncer o células tumorales.

30 En ciertas realizaciones, una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para tratar una enfermedad o trastorno mediado por células B, células plasmáticas o anticuerpos, tal como por ejemplo leucemia, linfoma, mieloma, amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa y vasculitis.

35 En otro aspecto, ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son agentes antimicrobianos, lo que significa que son capaces de tratar y/o prevenir la adquisición, desarrollo o consecuencias de infecciones microbiológicas patógenas, tales como causadas por virus, bacterias, hongos, priones o protozoos.

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



Está dentro del alcance de la presente invención proporcionar un receptor de médula ósea para la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad del huésped frente al injerto a través de la eliminación dirigida de células T del huésped usando una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la presente invención.

5 Las proteínas citotóxicas y composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden utilizar en un procedimiento de tratamiento del cáncer que comprende administrar a un paciente, en necesidad de las mismas, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína citotóxica o una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones de la presente descripción, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso (tal como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico (tal como cáncer de cerebro, neurofibromatosis o glioblastoma), cáncer gastrointestinal (tal como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (tal como cánceres de ovario y cánceres testiculares, cáncer glandular (tal como cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de la glándula salival o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza-cuello (tal como el cáncer nasofaríngeo, cáncer oral o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (tales como leucemia, linfoma o mieloma), cáncer renal-tracto urinario (tal como el cáncer renal y cáncer de vejiga), cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura (tal como, mesotelioma, carcinoma de pulmón de células pequeñas o carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata, sarcoma (tal como angiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi o sarcoma sinovial), cáncer de piel (tal como carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas o melanoma) y cáncer de útero.

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

30 Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una proteína citotóxica como componente de un medicamento para usar en el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, trastorno inmunitario o infección microbiana. Por ejemplo, los trastornos del sistema inmunitario que se presentan en la piel de un paciente pueden tratarse con tal medicamento con el fin de reducir la inflamación. En otro ejemplo, los tumores de la piel pueden ser tratados con dicho medicamento en un esfuerzo por reducir el tamaño del tumor o eliminar el tumor por completo.

35 Entre ciertas realizaciones de la presente descripción está un procedimiento de uso de una proteína citotóxica o composición farmacéutica de la invención para marcar o detectar los interiores de las células neoplásicas y/o tipos de células inmunitarias. Basándose en la capacidad de las proteínas citotóxica y composiciones farmacéuticas de la invención para entrar en tipos de células específicas y dirigirse dentro de las células a través de transporte intracelular retrógrado, los compartimientos interiores de tipos de células específicas están marcados para la detección. Esto se puede realizar en células in situ dentro de un paciente o en las células y los tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

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

## 50 EJEMPLOS

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

60 Los siguientes ejemplos demuestran la capacidad de las proteínas citotóxicas de ejemplo para eliminar selectivamente las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina. Las proteínas citotóxicas de ejemplo se unieron a las biomoléculas diana expresadas por los tipos de células diana y entraron en las células diana. Las proteínas citotóxicas internalizadas dirigieron su región efectora de toxina Shiga al citosol para inactivar los ribosomas y posteriormente causaron la muerte apoptótica de las células diana. Por lo tanto, las proteínas citotóxicas de ejemplo fueron capaces de reconocer tipos de células específicas en virtud de sus regiones de unión de tipo inmunoglobulina que acercan las proteínas citotóxicas a los tipos de células que están físicamente acopladas con una biomolécula diana de la región de unión de tipo inmunoglobulina.

Una realización de ejemplo comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga combinado con una región de unión de fragmento variable de cadena única capaz de unirse a CD38 con alta afinidad. Esta proteína citotóxica de ejemplo es capaz de eliminar selectivamente las células que expresan CD38 en su superficie. Una segunda proteína citotóxica de ejemplo comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga combinado con un fragmento de región de unión de anticuerpo de dominio único capaz de unirse a HER2 con alta afinidad. Esta segunda proteína citotóxica de ejemplo es capaz de eliminar selectivamente las células que expresan HER2 en su superficie. Una tercera realización de ejemplo comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga combinado con un fragmento de región de unión de anticuerpo de dominio único capaz de unirse a CD20 con alta afinidad. Esta tercera proteína citotóxica de ejemplo es capaz de eliminar selectivamente las células que expresan CD20 en su superficie. Otras proteínas citotóxicas de ejemplo incluyen aquellas con regiones de unión dirigidas a antígenos de Epstein-Barr, antígenos de Leishmania, receptores de neurotensina, receptores de factor de crecimiento epidérmico y CCR5.

### 15 **Ejemplo 1. Proteína citotóxica dirigida a CD38 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 ( $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A)**

#### Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica " $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A"

20 En primer lugar, se diseñaron o seleccionaron una región efectiva de la toxina Shiga y una región de unión de tipo inmunoglobulina. En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se derivó de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Se obtuvo un polinucleótido que codificaba los aminoácidos 1-251 de SLT-1A (Cheung M et al, Cancer Mol. 9: 28 (2010)). Una región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ CD38scFv se derivó del anticuerpo monoclonal  $\alpha$ CD38 HB7 (Peng et al., Blood 101: 2557-62 (2003); véase también GenBank Accession  
25 BD376144, Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE. UU.), de modo que se crea un fragmento variable de cadena única (scFv) con las dos regiones variables de inmunoglobulina ( $V_L$  y  $V_H$ ) separadas por un conector conocido en la técnica.

30 En segundo lugar, la región de unión de tipo inmunoglobulina y la región efectora de toxina Shiga se unieron entre sí para formar una proteína de fusión. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga que comprende los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1 se clonó en marco con un polinucleótido que codifica un conector derivado de una molécula de IgG3 murina y en marco con un polinucleótido que codifica la región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ CD38scFv que comprende los aminoácidos 269-508 de la SEQ ID NO: 4. En ciertos experimentos, la secuencia codificante de longitud completa de la proteína citotóxica de este ejemplo  
35 empezó con un polinucleótido que codificaba un Strep-tag® para facilitar la detección y purificación. La secuencia de polinucleótido que codifica la proteína citotóxica " $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A" de este ejemplo se optimizó en codones para la expresión eficaz en E. coli utilizando los servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, US).

40 En tercer lugar, se produjo una proteína de fusión mediante la expresión del polinucleótido que codifica la proteína citotóxica  $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A. La expresión de la proteína citotóxica " $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A" (SEQ ID NO: 4) se llevó a cabo utilizando los sistemas de traducción de proteínas bacterianos y libres de células.

45 En este ejemplo de producción de " $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A" por un sistema de expresión de E. coli, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica " $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A" se clonó en el vector pTxb1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) usando procedimientos estándar para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica " $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A" ligada en marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la inteína amino-terminal del vector. La secuencia del polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.) y se transformó en células T7 Shuffle® (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La proteína " $\alpha$ CD38-  
50 scFv fusionado con SLT-1A" se produjo y se purificó de acuerdo con el manual de sistema IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como usando dianas inmovilizadas de Strep-tag® o la región de unión de tipo inmunoglobulina.

55 En este ejemplo de producción de " $\alpha$ CD38scFv fusionado con SLT-1A" mediante un sistema de traducción de proteínas libre de células, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica " $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A" se clonó en el vector pIVEX2.3 con un codón de terminación inmediatamente después de la región de codificación utilizando el kit de clonación In-Fusion® HD (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante  
60 secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.). La proteína " $\alpha$ CD38-scFv fusionado con SLT-1A" se produjo usando el sistema de traducción rápida del kit 5 Prime™ RTS 100 E. coli Disulfide (5 Prime, Gaithersburg, MD, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como usando dianas inmovilizadas de Strep-tag® o la región de unión de tipo  
65 inmunoglobulina.

Determinación de la unión específica máxima (B<sub>max</sub>) y constante de equilibrio de unión (K<sub>D</sub>) de los tipos de células dirigidas a la unión de "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A"

5 Las características de unión de la proteína "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" producida como se describe anteriormente se determinaron mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia. Las muestras que contienen células CD38 positivas (+) y células CD38 negativas (-) se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato (1X PBS) (Hyclone Brand, Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) que contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 1 por ciento (Calbiochem, San Diego, CA, EE. UU.), en lo sucesivo denominado "1X PBS + 10 1% BSA" y se incubaron durante 1 hora a 4 grados Celsius (° C) con 100 μL de varias diluciones de la proteína "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" a analizar. Las concentraciones más altas de proteína "αCD38-scFv fusionada con SLT-1A" se seleccionaron para conducir a la saturación de la reacción de unión. Después de una hora de incubación, las muestras celulares se lavaron dos veces con 1X PBS + 1% de BSA. Las muestras de células se incubaron durante 1 hora a 4 °C con 100 μL de 1X PBS + 1% BSA que contenía 0,3 μg de mAb-FITC αStrep-tag® (# A01736-100, Genscript, Piscataway, NJ, EE. UU.).

Las muestras celulares se lavaron a continuación dos veces con 1X PBS + 1% BSA, se resuspendieron en 200 μl de 1X PBS y se sometieron a citometría de flujo basada en fluorescencia. Los datos de intensidad de fluorescencia media (MFI) para todas las muestras se obtuvieron regulando los datos utilizando una única muestra de FITC como control negativo. Los gráficos se representaron de MFI frente a "la concentración de las células", utilizando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Utilizando la función de software Prism de unión de un sitio  $[Y = B_{max} * X / (K_D + X)]$  bajo el encabezamiento de unión de saturación, se calcularon la B<sub>max</sub> y K<sub>D</sub> utilizando datos corregidos con la línea base. B<sub>max</sub> es la unión específica máxima descrita en MFI. K<sub>D</sub> es la constante de unión en equilibrio expresada en nanomolar (nM).

25 La B<sub>max</sub> para la unión de "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" a células CD38+ se midió que fue de aproximadamente 100.000 MFI con una K<sub>D</sub> de aproximadamente 13 nM (Tabla 1), mientras que no hubo unión a células CD38- observado en este ensayo.

30 **Tabla 1. Características de unión:** Valores representativos para B<sub>max</sub> y K<sub>D</sub> para proteínas citotóxicas de ejemplo

Proteína citotóxica	Biomolécula diana	Células positivas diana		Células negativas diana	
		B <sub>max</sub> (MFI)	K <sub>D</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (MFI)	K <sub>D</sub> (nM)
αCD38-scFv fusionado con SLT-1 <sup>a</sup>	CD38	104.000	13,40	sin unión	sin unión
αHER2-V <sub>HH</sub> fusionado con SLT-1 <sup>a</sup>	HER2	113.000	2,35	11.700	811
αCD20-scFv fusionado con SLT-1 <sup>a</sup>	CD20	139.000	82,50	15.800	1.050

Determinación de la concentración inhibidora semimáxima (IC<sub>50</sub>) de "αCD38-scFV fusionado con SLT-1A" para ribosomas de eucariotas *in vitro*

35 La capacidad de inactivación de ribosomas de "αCD38-scFV fusionado con SLT-1A" se determinó en un ensayo de traducción de proteínas libre de células, *in vitro*, utilizando el kit de transcripción/traducción TNT® Quick Coupled (L1170 Promega, Madison, WI, US). El kit incluye ADN de control de T7 luciferasa y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad de ribosoma se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

Una serie de diluciones de 10 veces de "αCD38-scFV fusionado con SLT-1A" a ensayar se preparó en tampón apropiado y se crearon una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A". Cada muestra en la serie de dilución de la proteína "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control de T7 luciferasa. Las muestras de ensayo se incubaron durante 1,5 horas a 30°C. Después de la incubación, se añadió reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE.UU.) a todas las muestras de ensayo y se midió la cantidad de traducción de la proteína luciferasa mediante luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición de la traducción se determinó por análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó la concentración inhibidora semimáxima (IC<sub>50</sub>) para cada muestra. A continuación, los datos se normalizaron mediante el cálculo del

"porcentaje de proteína de control de SLT-1A sola" usando la función de software Prism de log (inhibidor) vs. respuesta (tres parámetros)  $[Y = \text{Inferior} + ((\text{superior-inferior}) / (1 + 10^{-(X-\text{Log IC}_{50})}))]$  bajo el título de inhibición dosis-respuesta. Se calculó la IC<sub>50</sub> para las proteínas experimentales y la proteína de control positivo con SLT-1A sola. El porcentaje de proteína de control positivo con SLT-1A sola se calculó mediante  $[(\text{IC}_{50} \text{ de proteína de control SLT-1A} / \text{IC}_{50} \text{ de proteína experimental}) \times 100]$ .

El efecto inhibitorio de "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la IC<sub>50</sub> de "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células fue de aproximadamente 14 picomolar (pM) o dentro del 10% del control positivo sólo con SLT-1A (Tabla 2).

**Tabla 2. Inactivación de ribosomas:** Concentración inhibitoria semimáxima representativa (IC<sub>50</sub>) para proteínas citotóxicas de ejemplo

Proteína citotóxica	IC <sub>50</sub> (pM)	IC <sub>50</sub> de control positivo con SLT-1A solo (pM)	Porcentaje de IC <sub>50</sub> de la proteína de control SLT-1A
αCD38scFv fusionado con SLT-1A	13,7	15,0	110%
αHER2-V <sub>HH</sub> fusionado con SLT-1A	12,5	15,0	120%
αCD20scFv fusionado con SLT-1A	38,3	31,2	81%

Determinación de la citotoxicidad selectiva y la Concentración citotóxica semimáxima (CD<sub>50</sub>) de "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" se determinaron mediante el siguiente ensayo de eliminación celular. Este ensayo determina la capacidad de una proteína citotóxica para eliminar las células que expresan la biomolécula diana de su región de unión de tipo inmunoglobulina en comparación con células que no expresan la biomolécula diana. Las células se sembraron (2 x 10<sup>3</sup> células por pocillo) en 20 μl de medio en placas de 384 pocillos. La proteína "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" se diluyó 5 veces o 10 veces en 1X PBS y se añadieron 5 μl de las diluciones a las células. Los pocillos de control que contenían sólo medio se utilizaron para la corrección de la línea base. Las muestras de células se incubaron con "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" o simplemente tampón, durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). La supervivencia total de las células o porcentaje de viabilidad se determinaron utilizando una lectura luminiscente utilizando el ensayo de viabilidad CellTiter-Glo® Luminescent Cell (G7573 Promega Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación:  $(\text{RLU de prueba} - \text{RLU media promedio}) / (\text{RLU de células promedio} - \text{RLU media promedio}) \times 100$ . La concentración de polipéptido en forma log frente al porcentaje de viabilidad se representó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.) y se utilizó el análisis de log (inhibidor) vs. respuesta normalizada (pendiente variable) para determinar el valor de concentración citotóxica semimáxima (CD<sub>50</sub>) para "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A".

Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la CD<sub>50</sub> de la proteína "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" fue de aproximadamente de 0,2 a 0,7 nM para células CD38+ dependiendo de la línea celular en comparación con 470 nM para líneas celulares CD38-, que fue similar a la CD<sub>50</sub> para el control negativo de SLT-1A solo (Tabla 3; figura 2). La CD<sub>50</sub> de "αCD38-scFv fusionado con SLT-1A" fue aproximadamente 700-3000 veces mayor (menos citotóxicas) para las células no acopladas físicamente con la biomolécula diana extracelular CD38 en comparación con células que se acoplaron físicamente con la biomolécula diana extracelular CD38, por ejemplo, líneas celulares que expresan CD38 en su superficie celular.

**Tabla 3. Citotoxicidad selectiva:** Concentraciones citotóxicas semimáximas representativas (CD<sub>50</sub>) para αCD38-scFv fusionado con SLT-1A

Línea celular	Estado HER2	CD <sub>50</sub> (nM)	
		αCD20-scFv fusionado con SLT-1A	SLT-1A sólo control negativo
Daudi	positivo	0,28	750
Raji	positivo	0,68	1.100
ST486	positivo	0,21	940
BC-1	positivo	0,18	510
U226	negativo	470,00	490

**Ejemplo 2. Una proteína citotóxica dirigida a HER2 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 ( $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A)**5 Construcción, producción y purificación de " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A"

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se derivó de la subunidad A de la Toxina 1 semejante a Shiga (SLT-1A). Se obtuvo un polinucleótido que codificaba los aminoácidos 1-251 de SLT-1A (Cheung M et al., Mol Cancer 9: 28 (2010)). La región de unión de tipo inmunoglobulina es  $\alpha$ HER2  $V_{HH}$  derivada de una región variable de dominio único de la proteína 5F7 de anticuerpo de camélido ( $V_{HH}$ ), tal como se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2011/0059090.

En segundo lugar, la región de unión de tipo inmunoglobulina y la región efectora de toxina Shiga se unieron entre sí para formar una proteína de fusión. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región variable  $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  derivada de la proteína 5F7 que comprende los aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 5 se clonó en marco con un polinucleótido que codifica un conector conocido en la técnica y en marco con un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga que comprende los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1. En ciertos experimentos, la secuencia de codificación de longitud completa de la proteína citotóxica de este ejemplo comenzó con un polinucleótido que codifica un Strep-tag® para facilitar la detección y purificación. La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" de este ejemplo se optimizó en codones para la expresión eficiente en *E. coli* utilizando servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, EE. UU.).

La proteína de fusión " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" (SEQ ID NO: 5) se produjo mediante la expresión del polinucleótido que la codifica. La expresión de la proteína citotóxica " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se realizó utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianas y libres de células.

En este ejemplo de producción de " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" mediante un sistema de expresión de *E. coli*, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se clonó en el vector pTxb1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.) utilizando procedimientos estándar para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" ligada en el marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína amino terminal del vector. La secuencia de polinucleótidos del inserto de plásmido se verificó mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE. UU.) y se transformó en las células T7 Shuffle® (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). La proteína " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se produjo y purificó de acuerdo con el manual del sistema IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.). La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como usando dianas inmovilizadas de Strep-tag® o la región de unión de tipo inmunoglobulina.

En este ejemplo de producción de " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" mediante un sistema de traducción de proteínas libre de células, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se clonó en el vector pIVEX2.3 con un codón de terminación inmediatamente después de la región de codificación utilizando el kit de clonación In-Fusion® HD (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de polinucleótido de inserto del plásmido fue verificada mediante secuenciación de Sanger (Functional Biosciences, Madison, WI, EE.UU.). La proteína " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se produjo usando el sistema de traducción rápida del kit 5 Prime™ RTS 100 *E. coli* Disulfide (5 Prime, Gaithersburg, MD, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La purificación se llevó a cabo utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como usando dianas inmovilizadas de Strep-tag® o la región de unión de tipo inmunoglobulina.

50 Determinación de la unión específica máxima ( $B_{max}$ ) y constante de equilibrio de unión ( $K_D$ ) de " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" a un tipo de células dirigida

Las características de unión de la proteína " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" producida como se describe anteriormente se determinaron mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia. Las muestras que contienen células HER2 positivas (+) y células HER2 negativas (-) se suspendieron 1X PBS + 1% BSA y se incubaron durante 1 hora a 4 °C con 100  $\mu$ L de varias diluciones de la proteína " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" a analizar. Las concentraciones más altas de proteína " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se seleccionaron para conducir a la saturación de la reacción de unión. Después de una hora de incubación, las muestras celulares se lavaron dos veces con 1X PBS + 1% de BSA. Las muestras de células se incubaron durante 1 hora a 4 °C con 100  $\mu$ L de 1X PBS + 1% BSA que contenía 0,3  $\mu$ g de mAb-FITC  $\alpha$ Strep-tag® (# A01736-100, Genscript, Piscataway, NJ, EE. UU.).

Las muestras celulares se lavaron a continuación dos veces con 1X PBS + 1% BSA, se resuspendieron en 200  $\mu$ L de 1X PBS y se sometieron a citometría de flujo basada en fluorescencia. Los datos de intensidad de fluorescencia

media (MFI) para todas las muestras se obtuvieron regulando los datos utilizando una única muestra de FITC como control negativo. Los gráficos se representaron de MFI frente a "la concentración de las células", utilizando el programa Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Utilizando la función de software Prism de unión de un sitio [ $Y = B_{max} * X / (K_D + X)$ ] bajo el encabezamiento de unión de saturación, se calcularon la  $B_{max}$  y  $K_D$  utilizando datos corregidos con la línea base.  $B_{max}$  es la unión específica máxima descrita en MFI.  $K_D$  es la constante de unión en equilibrio expresada en nanomolar (nM).

La  $B_{max}$  para la unión de "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" a células HER2+ se midió que fue de aproximadamente 110.000 MFI con una  $K_D$  de aproximadamente 2,4 nM (Tabla 1), mientras que la  $B_{max}$  para la unión de "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" a células HER2- se midió que fue de aproximadamente 12.000 MFI con una  $K_D$  de aproximadamente 810 nM (Tabla 1)

#### Determinación de la concentración inhibidora semimáxima ( $IC_{50}$ ) de "αHER2- $V_{HH}$ fusionado con SLT-1A" para ribosomas de eucariotas *in vitro*

La capacidad de inactivación de ribosomas de "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se determinó en un ensayo de traducción de proteínas libre de células, *in vitro*, utilizando el kit de transcripción/traducción TNT® Quick Coupled (L1170 Promega, Madison, WI, US). El kit incluye ADN de control de T7 luciferasa y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad de ribosoma se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

Una serie de diluciones de 10 veces de "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" a ensayar se preparó en tampón apropiado y se crearon una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A". Cada muestra en la serie de dilución de la proteína "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control de T7 luciferasa. Las muestras de ensayo se incubaron durante 1,5 horas a 30°C. Después de la incubación, se añadió reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE.UU.) a todas las muestras de ensayo y se midió la cantidad de traducción de la proteína luciferasa mediante luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición de la traducción se determinó por análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó la concentración inhibidora semimáxima ( $IC_{50}$ ) para cada muestra. A continuación, los datos se normalizaron mediante el cálculo del "porcentaje de proteína de control de SLT-1A sola" usando la función de software Prism de log (inhibidor) vs. respuesta (tres parámetros) [ $Y = \text{Inferior} + ((\text{superior-inferior}) / (1 + 10^{-(X - \text{Log } IC_{50})}))$ ] bajo el título de inhibición dosis-respuesta. Se calculó la  $IC_{50}$  para las proteínas experimentales y la proteína de control positivo con SLT-1A sola. El porcentaje de proteína de control positivo con SLT-1A sola se calculó mediante [( $IC_{50}$  de proteína de control SLT-1A/ $IC_{50}$  de proteína experimental) x 100].

El efecto inhibitorio de "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos de dependencia de dosis determinaron que la  $IC_{50}$  de "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células fue de aproximadamente 13 pM o similar a la del control positivo con sólo SLT-1A (Tabla 2).

#### Determinación de la citotoxicidad selectiva y la concentración citotóxica semimáxima ( $CD_{50}$ ) de "αHER2- $V_{HH}$ fusionado con SLT-1A" utilizando un ensayo de eliminación de células

Las características de citotoxicidad de "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se determinaron mediante el siguiente ensayo de eliminación celular. Este ensayo determina la capacidad de una proteína citotóxica para eliminar las células que expresan la biomolécula diana de su región de unión de tipo inmunoglobulina en comparación con células que no expresan la biomolécula diana. Las células se sembraron ( $2 \times 10^3$  células por pocillo) en 20 µl de medio en placas de 384 pocillos. La proteína "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" se diluyó 5 veces o 10 veces en 1X PBS y se añadieron 5 µl de las diluciones a las células. Los pocillos de control que contenían sólo medio se utilizaron para la corrección de la línea base. Las muestras de células se incubaron con "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" o simplemente tampón, durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono ( $CO_2$ ). La supervivencia total de las células o porcentaje de viabilidad se determinaron utilizando una lectura luminiscente utilizando el ensayo de viabilidad CellTiter-Glo® Luminescent Cell (G7573 Promega Madison, WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación: (RLU de prueba - RLU media promedio)/(RLU de células promedio - RLU media promedio) \* 100. La concentración de polipéptido en forma log frente al porcentaje de viabilidad se representó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.) y se utilizó el análisis de log (inhibidor) vs. respuesta normalizada (pendiente variable) para determinar el valor de concentración citotóxica semimáxima ( $CD_{50}$ ) para "αHER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A".

Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la  $CD_{50}$  de la proteína " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" fue de aproximadamente 15 nM para una línea celular HER2+ en comparación con aproximadamente 1700 nM para una línea celular HER2 (Tabla 4; Figura 3). La  $CD_{50}$  de la proteína " $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A" fue aproximadamente 110 veces mayor (menos citotóxico) para las células no físicamente acopladas con la biomolécula diana extracelular HER2 en comparación con las células que estaban físicamente acopladas con la biomolécula diana extracelular HER2, por ejemplo, una línea celular que expresa HER2 en su superficie celular.

**Tabla 4. Citotoxicidad selectiva:** Concentraciones citotóxicas semimáximas representativas ( $CD_{50}$ ) para  $\alpha$ HER2- $V_{HH}$  fusionado con SLT-1A

Línea celular	Estado HER2	$CD_{50}$ (nM)	
		$\alpha$ HER2- $V_{HH}$ fusionado con SLT-1 <sup>a</sup>	SLT-1A sólo control negativo
SKBR3	positivo	14,9	2.610,0
MCF7	negativo	1.650,0	92,0

**Ejemplo 3. Una proteína citotóxica dirigida a CD20 derivada de la subunidad A de la toxina 1 semejante a Shiga 1 ( $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A)**

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se deriva de la subunidad A de la Toxina 1 semejante a Shiga (SLT-1A). Se diseñó una región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ CD20-scFv como un scFv recombinante derivado del anticuerpo monoclonal 1H4 CD20 (Haisma et al. (1999), Blood 92: 184-90), que comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a CD20 humano. Estas regiones heterólogas se combinaron como se describe anteriormente en los Ejemplos 1-2. Brevemente, un polinucleótido que codifica el scFv recombinante derivado del anticuerpo monoclonal CD20 1H4 se clonó en marco con un polinucleótido derivado que codifica una "bisagra murina" de una molécula de IgG3 murina y en marco con un polinucleótido que codifica SLT-1A (residuos 1-251 de la SEQ ID NO: 1). Una proteína citotóxica dirigida a CD20 diferente, " $\alpha$ CD20scFv fusionado con SLT-1A" versión 2 se construyó y produjo de una manera similar que difería solo en la región de enlace entre la  $\alpha$ CD20-scFv y la región efectora de la toxina Shiga derivada de y SLT1-A. La expresión de ambas versiones de la proteína citotóxica " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" se realizó utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianas y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

Las características de unión celular de la proteína citotóxica " $\alpha$ CD20scFv fusionada con SLT-1A" se determinaron mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia, tal como se describe en los Ejemplos 1-2. En múltiples experimentos, se determinó que la  $K_D$  de " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" para las células Raji (CD20+) era de aproximadamente 80-100 nM. En un experimento, se midió que  $B_{max}$  para " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" era de aproximadamente 140.000 MFI con una  $K_D$  de aproximadamente 83 nM, mientras que no hubo una unión significativa a células CD20- observada en este ensayo (Tabla 1).

El efecto inhibitor de " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Múltiples experimentos determinaron que la  $IC_{50}$  de " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" fue de alrededor de 50 pM. En un experimento, la  $IC_{50}$  de " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" en la síntesis de la proteína fue aproximadamente 38 pM o dentro de 19% del control positivo con sólo SLT-1A (Tabla 2).

Los perfiles de citotoxicidad de " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" se determinaron mediante un ensayo de eliminación celular, tal como se describe en los ejemplos 1-2, pero reconociendo células CD20. En múltiples experimentos, " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" demostró la eliminación celular específica de CD20 con una especificidad de 10 a 1000 veces en comparación con la muerte celular de líneas celulares negativas CD20. Se midió que la  $CD_{50}$  de la proteína " $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A" fue de aproximadamente 3-70 nM para las células CD20+, dependiendo de la línea celular, en comparación con casi 600-2.000 para las líneas de células CD20 (Tabla 5). La  $CD_{50}$  de la proteína " $\alpha$ CD20-scFv fusionada con SLT-1A" fue casi de 100 a 400 veces mayor (menos citotóxico) para las células que no estaban físicamente acopladas con una diana extracelular CD20 en comparación con las células físicamente acopladas con la biomolécula diana extracelular CD20.

**Tabla 5. Citotoxicidad selectiva:** Concentraciones citotóxicas semimáximas representativas ( $CD_{50}$ ) para  $\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A

Línea celular	Estado HER2	$CD_{50}$ (nM)	
		$\alpha$ CD20-scFv fusionado con SLT-1A	SLT-1A sólo control negativo
Daudi	positivo	5,6	650
Raji	positivo	2,8	1.100

ST486	positivo	3,7	940
Ramos	positivo	27,0	470
BC-1	negativo	2.000	160
Jurkat	negative	1.400	120
U226	negative	2.500	960

#### Determinación de la citotoxicidad dirigida de una proteína citotóxica utilizando estudios de xenoinjerto *in vivo*

5 Se utilizaron dos sistemas modelo de xenoinjerto basados en cepas de ratón inmunocomprometidas para estudiar la capacidad de las proteínas citotóxicas "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versiones 1 y 2 para eliminar células tumorales CD20+ *in vivo* y en un entorno tumoral a lo largo del tiempo y para diversas dosis. Estos sistemas modelo de xenoinjerto se basan en cepas de ratón bien caracterizadas que carecen de respuestas de injerto contra huésped, entre otras deficiencias del sistema inmune. En primer lugar, se estudió un modelo de tumor intravenoso usando ratones SCID (inmunodeficiencia combinada severa) para crear tumores diseminados a lo largo de los ratones con el fin de probar los efectos *in vivo* de "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" en células tumorales humanas. En segundo lugar, se estudió un modelo de tumor subcutáneo utilizando ratones BALBc/desnudos para crear tumores subcutáneos en los ratones, nuevamente para probar los efectos *in vivo* de "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" en células tumorales humanas.

15 Para el primer sistema de xenoinjerto, treinta y dos ratones SCID CB-17 (en cuatro grupos de ocho animales) fueron estimulados con  $1 \times 10^7$  células derivadas de linfoma humano Raji-luc (Molecular Imaging, Ann Arbor, MI, EE. UU.) en 200 μL de PBS. En los días 5-9 y 12-16 después de la estimulación tumoral, los grupos recibieron a través de la administración intravenosa lo siguiente por grupo: Grupo 1: PBS; Grupo 2: "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 2 a una dosis de 2 mg/kg; Grupo 3: "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 1 a una dosis de 2 mg/kg; y Grupo 4: αCD20scFv::SLT-1A versión 1 a una dosis de 4 mg/kg (solo días 5-9). La bioluminiscencia, en unidades de  $1 \times 10^6$  fotones/segundo (p/s), se midió en los días 5, 10, 15 y 20 utilizando un sistema óptico de imágenes Caliper IVIS 50 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EE. UU.). La Figura 4 muestra cómo ambas versiones de "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" y "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 1 en ambos niveles de dosificación, dieron como resultado una bioluminiscencia total estadísticamente menos significativa en comparación con el control de PBS. La disminución en la bioluminiscencia total fue un reflejo de reducciones estadísticamente significativas en las cargas tumorales diseminadas después del tratamiento con una proteína citotóxica de la invención. La Figura 5 indica un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia con la administración de cualquiera de las versiones de αCD20scFv::SLT-1A. La edad media de supervivencia se incrementó en cinco días con todos los tratamientos en comparación con el control de PBS.

30 Para el segundo modelo de xenoinjerto, veintiocho BALBc/desnudo (en cuatro grupos de seis o siete animales) fueron estimulados por vía subcutánea con  $2,5 \times 10^6$  células de linfoma humano Raji (Washington Biotechnology, Simpsonville, MD, EE.UU.). El volumen tumoral se determinó utilizando procedimientos estándar conocidos en la técnica utilizando calibradores. El día 0 se estableció en el punto en que el volumen tumoral promedio para cada ratón alcanzó aproximadamente 160 mm<sup>3</sup> (un ratón de cada grupo tenía un tumor mayor de 260 mm<sup>3</sup> por lo que se excluyó). En los días 0-4 y 7-11 los grupos recibieron la administración intravenosa de lo siguiente por grupo: Grupo 1: PBS; Grupo 2: "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 2 a una dosis de 2 mg/kg; Grupo 3: "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 1 a una dosis de 2 mg/kg; Grupo 4: "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 1 a una dosis de 4 mg/kg. El volumen del tumor se midió y se representó en función del día de estudio. La Figura 6 demuestra cómo el tratamiento con "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" (en ambos niveles de dosificación) dio lugar a un volumen tumoral significativamente reducido en comparación con el control de PBS hasta el día 24. Esto también se refleja en el número de ratones sin tumor hasta el día 54, indicado en la Tabla 6.

45 **Tabla 6. Eliminación de tumores mediante proteínas citotóxicas de ejemplo en un modelo de ratón con tumor subcutáneo**

Grupo	Ratones sin tumor/Ratones totales
PBS	0/7
αCD20-scFv fusionado con SLT-1A versión 1,2 mg/kg	5/6
αCD20-scFv fusionados con SLT-1A versión 1,4 mg/kg	6/7

#### Determinación de los efectos *in vivo* de una proteína citotóxica en primates no humanos

50 La proteína citotóxica de ejemplo "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 1 se administró a primates no humanos para probar los efectos *in vivo*. Se observó el agotamiento *in vivo* de linfocitos B de sangre periférica en primates cynomolgus después de la administración parenteral de diferentes dosis de "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 1.



En un experimento, se inyectaron diez primates cynomolgus por vía intravenosa con PBS o "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 1 a diferentes dosis (50, 150 y 450 microgramos de fármaco/kilogramo de peso corporal (mcg/kg)) en días alternativos durante 2 semanas. A continuación, las muestras de sangre periférica recogidas antes de la dosificación en los días 3 y 8 se analizaron para determinar el porcentaje de linfocitos B que expresaban CD20 (Figuras 7 y 8). En los monos cynomolgus, se han descrito dos subconjuntos distintos de células B; Células CD21 negativas, CD40 positivas que expresan un alto nivel de CD20, y CD21 positivas y CD40 positivas que expresan un nivel más bajo de CD20 que por citometría de flujo (Vugmeyster et al., Cytometry 52: 101-9 (2003)). En el día 3 (disminución de 4, 14 y 45% en animales a los que se les administró dosis de 50, 150 y 450 mcg/kg) y el día 8 (disminución de 32, 52 y 75% en animales dosificados a 50, 150 y 450 mcg/kg) (Tabla 7) se observó un agotamiento de las células B dependiente de la dosis en comparación con los niveles basales de las muestras de sangre recogidas antes del tratamiento. Este experimento demostró que "αCD20-scFv fusionado con SLT-1A" versión 1 era capaz de matar células B de primates CD20 positivas *in vivo*.

**Tabla 7. Agotamiento de células B dependiente de la dosis de la proteína Anti-CD20-scFv fusionado con SLT-1A Versión 1 en primates no humanos**

Día	% disminución CD40+, CD20+			% disminución CD21+, CD40+, CD20+		
	50 mcg/kg	150 mcg/kg	450 mcg/kg	50 mcg/kg	150 mcg/kg	450 mcg/kg
3	38	57	69	4	14	45
8	65	81	86	32	52	75

**Ejemplo 4. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo αEpstein-Barr-antígeno**

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

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

La región de unión de tipo inmunoglobulina αEpstein-Barr-antígeno y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a αEpsteinBarr-antígeno SLT-1A::αEpsteinBarr. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A::αEpsteinBarr se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianas y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A::αEpsteinBarr

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células positivas de antígeno de Epstein-Barr y células negativas de antígeno de Epstein-Barr se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La Bmax para SLT-1A::αEpsteinBarr a células positivas de antígeno de Epstein-Barr se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K<sub>D</sub> dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de antígeno de Epstein-Barr en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::αEpsteinBarr se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC<sub>50</sub> de SLT-1A::αEpsteinBarr en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

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

Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αEpsteinBarr se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de antígeno de Epstein-Barr. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A::αEpsteinBarr se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de antígeno de Epstein-Barr como una comparación con las células positivas de antígeno de Epstein-Barr. La CD<sub>50</sub> de la proteína

citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de antígeno de Epstein-Barr, dependiendo de la línea celular. La  $CD_{50}$  de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan el antígeno de Epstein-Barr en una superficie celular, en comparación con células que expresan el antígeno de Epstein-Barr en una superficie celular.

#### 5 Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ EpsteinBarr utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ EpsteinBarr en células neoplásicas. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan antígenos de Epstein-Barr en sus superficies celulares.

#### 15 **Ejemplo 5. Proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo $\alpha$ Leishmania-antígeno**

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ Leishmania-antígeno deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, a un antígeno de Leishmania de la superficie celular presente en las células humanas que albergan protozoos tripanosomátidos intracelulares (véase Berman J, Dwyer, Clin Exp Immunol 44: 342-348 (1981); Kenner J et al, J Cutan Pathol 26: 130-6 (1999); Silveira T et al, Int J Parasitol. 31: 1451-8 (2001)).

#### 20 Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ Leishmania

25 La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ Leishmania-antígeno y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a  $\alpha$ Leishmania-antígeno SLT-1A:: $\alpha$ Leishmania. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ Leishmania se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

#### 30 Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ Leishmania

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células positivas de antígeno de Leishmania y células negativas de antígeno de Leishmania se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La  $B_{max}$  para SLT-1A:: $\alpha$ Leishmania a células positivas de antígeno de Leishmania se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una  $K_D$  dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de antígeno de Leishmania en este ensayo.

40 La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ Leishmania se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La  $IC_{50}$  de SLT-1A:: $\alpha$ Leishmania en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

#### 45 Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ Leishmania utilizando un ensayo de eliminación celular

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

#### 60 **Ejemplo 6. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y la región de unión de tipo inmunoglobulina $\alpha$ Neurotensina-Receptor**

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ Neurotensina-Receptor deriva de DARPin™ (GenBank Acceso: 2P2C\_R) o un anticuerpo monoclonal (Ovigne J et al, Neuropeptides 32: 247-56 (1998)) que se une al receptor de neurotensina humana. El receptor de neurotensina es expresado por varias células cancerosas, tales

como células de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, melanoma y cáncer pancreático.

#### Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ NeurotensinR

5 La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ NeurotensinR y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión al receptor de neurotensina SLT-1A::  $\alpha$ NeurotensinR. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ NeurotensinR se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianas y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

10

#### Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ NeurotensinR

15 Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células positivas de receptor de neurotensina y células negativas de receptor de neurotensina se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B<sub>max</sub> para SLT-1A::  $\alpha$ NeurotensinR a células positivas de receptor de neurotensina se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K<sub>D</sub> dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de receptor de neurotensina en este ensayo.

20 La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ NeurotensinR se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC<sub>50</sub> de SLT-1A:: $\alpha$ NeurotensinR en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

25

#### Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ NeurotensinR utilizando un ensayo de eliminación celular

30 Las características de citotoxicidad de SLT-1A::  $\alpha$ NeurotensinR se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de receptor de neurotensina. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A::  $\alpha$ NeurotensinR::KDEL se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de receptor de neurotensina como una comparación con las células positivas de receptor de neurotensina. La CD<sub>50</sub> de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de receptor de neurotensina, dependiendo de la línea celular. La CD<sub>50</sub> de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan el receptor de neurotensina en una superficie celular, en comparación con células que expresan el receptor de neurotensina en una superficie celular.

35

#### Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ NeurotensinR utilizando modelos animales

40

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ NeurotensinR en células neoplásicas. Se utilizan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en los ratones de células neoplásicas humanas que expresan receptores de neurotensina en sus superficies celulares.

45

#### **Ejemplo 7. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y una región de unión de tipo inmunoglobulina $\alpha$ EGFR**

50 En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ EGFR deriva de AdNectin™ (GenBank acceso: 3QWQ\_B), Affibody™ (GenBank acceso: 2KZI\_A; patente de EE.UU. 8.598.113), o un anticuerpo, todos ellos se unen a uno o más receptores del factor de crecimiento epidérmico humano. La expresión de los receptores del factor de crecimiento epidérmico se asocia con células de cáncer humanas, tales como, por ejemplo, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de mama y células de cáncer de colon.

55

#### Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ EGFR

60 La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ EGFR y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a EGFR SLT-1A:: $\alpha$ EGFR. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ EGFR se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

#### Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ EGFR

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células EGFR+ y células EGFR- se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B<sub>max</sub> para SLT-1A::αEGFR a células EGFR+ se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K<sub>D</sub> dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células EGFR- en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::α EGFR se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro* tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC<sub>50</sub> de SLT-1A::αEGFR en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

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

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

#### Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A::αEGFR utilizando modelos animales

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

#### **Ejemplo 8. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo αCCR5**

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina αCCR5 deriva de un anticuerpo monoclonal contra CCR5 humano (CD195) (Bernstone L et al, Hybridoma 31: 7-19 (2012)). CCR5 se expresa predominantemente en las células T, macrófagos, células dendríticas y microglia. Además, CCR5 juega un papel en la patogénesis y la propagación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

#### Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5

La región de unión de tipo inmunoglobulina αCCR5 y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a αCCR5 SLT-1A::αCCR5. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5 se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

#### Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células CCR5+ y células CCR5- se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B<sub>max</sub> para SLT-1A::αCCR5 a células positivas CCR5+ se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K<sub>D</sub> dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células CCR5- en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::αCCR5 se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro*, tal como se describe anteriormente, en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La IC<sub>50</sub> de SLT-1A::αCCR5 en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

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

celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: $\alpha$ CCR5 se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células CCR5+. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A:: $\alpha$ CCR5 se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células CCR5- como una comparación con las células CCR5+. La  $CD_{50}$  de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células CCR5+, dependiendo de la línea celular. La  $CD_{50}$  de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan CCR5 en una superficie celular, en comparación con células que expresan CCR5 en una superficie celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ CCR5 utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ CCR5 en el agotamiento de células T de materiales donantes (ver Tsigotis P et al, Immunotherapy 4: 407-24 (2012)). Los primates no humanos se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de SLT-1A:: $\alpha$ CCR5. La enfermedad de injerto contra huésped se analiza en macacos rhesus después del trasplante renal cuando los órganos donados se tratan previamente con SLT-1A:: $\alpha$ CCR5 (véase Weaver T et al, Nat Med. 15: 746-9 (2009)). Se observa agotamiento *in vivo* de linfocitos T de sangre periférica en primates cynomolgus después de la administración parenteral de diferentes dosis de SLT-1A:: $\alpha$ CCR5. El uso de SLT-1A:: $\alpha$ CCR5 para bloquear la infección por VIH se prueba administrando una dosis aguda de SLT-1A:: $\alpha$ CCR5 a primates no humanos con el fin de agotar severamente las células T circulantes tras la exposición a un virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) (ver Sellier P et al, PLoS One 5: e10570 (2010)).

**Ejemplo 9. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo  $\alpha$ UL18**

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga deriva de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ UL18 deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, para la proteína de citomegalovirus de superficie celular UL18, que está presente en las células humanas infectadas con citomegalovirus (Yang Z, Bjorkman P, Proc Natl Acad Sci USA. 105: 10095-100 (2008)). La infección por citomegalovirus humano se asocia con varios tipos de cáncer y trastornos inflamatorios.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ UL18

La región de unión de tipo inmunoglobulina  $\alpha$ UL18 y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a  $\alpha$ UL18 SLT-1A:: $\alpha$ UL18. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ UL18 se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianas y/o libres de células, tal como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ UL18

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células positivas de la proteína de citomegalovirus UL18 y células negativas de la proteína de citomegalovirus UL18 se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basada en fluorescencia, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La  $B_{max}$  para SLT-1A:: $\alpha$ UL18 a células positivas de proteína de citomegalovirus UL18 se mide que es de aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una  $K_D$  dentro del intervalo de 0,01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a células negativas de proteína de citomegalovirus UL18 en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ UL18 se determina en una traducción de proteínas libre de células *in vitro*, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo en la síntesis de proteínas libre de células es significativo. La  $IC_{50}$  de SLT-1A:: $\alpha$ UL18 en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: $\alpha$ UL18 utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: $\alpha$ UL18 se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas de la proteína de citomegalovirus UL18. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A:: $\alpha$ UL18 se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de proteína de citomegalovirus UL18 como una comparación con las células positivas de proteína de citomegalovirus UL18. La  $CD_{50}$  de la proteína

5 citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de la proteína de citomegalovirus UL18, dependiendo de la línea celular. La CD<sub>50</sub> de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para células que no expresan la proteína de citomegalovirus UL18 en una superficie celular, en comparación con células que expresan la proteína de citomegalovirus UL18 en una superficie celular.

**Ejemplo 10. Diversas proteínas citotóxicas dirigidas a varios tipos de células.**

10 En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se deriva de la subunidad A de la toxina 1 semejante a Shiga (SLT-1A), la toxina Shiga (StxA) y/o la toxina 2 semejante a Shiga (SLT-2A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva del dominio de inmunoglobulina de la molécula elegida de la columna 1 de la Tabla 8 y que se une a la biomolécula diana extracelular indicada en la columna 2 de la Tabla 8. Las proteínas citotóxicas de ejemplo de este ejemplo se crean y prueban como se describe en los ejemplos anteriores usando células que expresan las biomoléculas diana extracelulares apropiadas. Las proteínas de ejemplo de este ejemplo pueden usarse para diagnosticar y tratar las enfermedades, afecciones o trastornos indicados en la columna 3 de la Tabla 8.

**Tabla 8. Varias regiones de unión de tipo inmunoglobulina para el reconocimiento celular de proteínas citotóxicas**

Fuente de la región de unión	Diana extracelular	Aplicación o aplicaciones
alemtuzumab	CD52	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
basiliximab	CD25	trastornos de células T, tales como la prevención de rechazos de trasplante de órganos y algunos cánceres del linaje de células B
brentuximab vedotin	CD30	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
catumaxomab	EpCAM	varios cánceres, tales como cáncer de ovario, ascitis maligna, cáncer gástrico
cetuximab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorrectal y de cabeza y cuello
daclizumab	CD25	cánceres de linaje de células B y trastornos de células T, tales como el rechazo de trasplante de órganos
dinutuximab	gangliósido GD2	Varios cánceres, tales como cáncer de mama, cánceres mieloides y neuroblastoma
efalizumab	LFA-1 (CD11a)	trastornos autoinmunes, tales como psoriasis
gemtuzumab	CD33	cáncer mielóide o trastorno inmunitario
ibritumomab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ipilimumab	CD152	trastornos relacionados con células T y varios cánceres, tales como leucemia, melanoma
muromonab	CD3	prevención de los rechazos de trasplante de órganos
natalizumab	integrina $\alpha$ 4	trastornos autoinmunes, tales como esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn
obinutuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ofatumumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
palivizumab	Proteína F del virus sincitial respiratorio	tratar el virus sincitial respiratorio
panitumumab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorrectal y cáncer de cabeza y cuello
pertuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorrectal
ramucirumab	VEGFR2	varios cánceres y trastornos relacionados con cáncer, tales como tumores sólidos

rituximab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
tocilizumab o atlizumab	receptor de IL-6	trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide
tositumomab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
trastuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
vedolizumab	integrina $\alpha 4\beta 7$	trastornos autoinmunes, tales como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa
scFv de unión a CD20 Geng S et al. Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006); Olafesn T et al. Protein Eng Des Sel 23: 243-9 (2010)	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
scFv de unión a CD22 Kawas S et al. MAbs s: 479-86 (2011)	CD22	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B
scFv de unión a CD25 Muramatsu H et al., Cancer Lett 225: 225-36 (2005)	CD25	varios cánceres de linaje de células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD30, Klimka A et al., Br J Cancer 83: 252-60 (2000))	CD30	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B/células T
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD33 Benedict C et al., J Immunol Methods 201: 223-31 (1997)	CD33	cáncer mielóide o trastorno inmunitario
scFv de unión a CD40 Ellmark P et al., Immunology 106: 456-63 (2002)	CD40	varios cánceres y trastornos inmunitarios
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD52 patente de Estados Unidos 7,910,104 B2	CD52	Cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD56 Shin J et al., Hybridoma 18: 521-7 (1999)	CD56	trastornos inmunitarios y varios cánceres, tales como cáncer de pulmón, Merkel cell carcinoma, mieloma
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD79 Zhang L et al. Ther. Immunol. 2: 191-202 (1995))	CD79	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B
scFv de unión a CD248 Zhao A et al., J Immunol Methods 363: 221-32 (2011)	CD248	varios cánceres, tales como angiogénesis inhibidora
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a EpCAM Schanzer J et al., J Immunother 29: 477-88 (2006))	EpCAM	varios cánceres, tales como cáncer de ovario, ascitis malignos, cáncer gástrico
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a PSMA Frigerio B et al., Eur J Cancer 49: 2223-32 (2013)	PSMA	cáncer de próstata
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a Eph-B2 Abéngozar M et al., Blood 119: 4565-76 (2012)	Eph-B2	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y cáncer de próstata
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a endoglina Völkel T et al., Biochim Biophys Res Acta 1663: 158-66 (2004)	Endoglina	varios cánceres, tales como cáncer de mama y cánceres colorectales
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a FAP Zhang	FAP	varios cánceres, tales como sarcomas y cánceres de hueso

J et al., FASEB J 27: 581-9 (2013) anticuerpo o anticuerpos de unión a CEA Zhu et al. Cancer Biol. Ther. 8: 1034-44 (2009)	CEA	varios cánceres, tales como cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón y cáncer de mama
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD24 Kristiansen G et al., Lab Invest 90: 1102-16 (2010)	CD24	varios cánceres, tales como cáncer de vejiga
scFv de unión a antígenos de Lewis Y Power B et al., Protein Sci 12: 734-47 (2003); monoclonal antibody BR96 Feridani A et al., Cytometry 71: 361-70 (2007)	antígenos de Lewis Y	varios cánceres, tales como cáncer de cuello de útero y cáncer uterino

Listado de secuencias		
Número ID	Descripción del texto	Secuencia biológica
SEQ ID NO: 1	Subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNL FAVDVRGIDPEEGRFNRLRIVER NNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFS HVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS HSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAE ALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASRVARMASDEFPSMCP ADGRVRGITHNKILWDSSTLGAIL MRRTISS
SEQ ID NO: 2	Subunidad A de la toxina Shiga	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDN LFAVDVRGIDPEEGRFNRLRIVE RNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLM SHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTA EALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSY VMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDY HGQDSVRVGRISFGSINAILGSVA LILNCHHHASRVARMASDEFPSM CPADGRVRGITHNKILWDSSTLGA ILMRRTISS



<p>SEQ ID NO: 3</p>	<p>Subunidad A de la toxina semejante a Shiga 2 (SLT-2A)</p>	<p>DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAIS  TPLGNISQGGVSVSVINHVLLGGNY  ISLNVRGLDPYSERFNHLRLIMER  NNLYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI  SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIADL  ERTGMQIGRHSLVGSYLDLMEFR  GRSMTRASSRAMLRFVTVIAEAL  RFRQIQRGFRPALSEASPLYTMTA  QDVDLTLNWGRISNVLPEYRGEE  GVRIGRISFNLSAILGSVAVILNC  HSTGYSVRSVSQKQKTECQIVGD  RAAIKVNNVLWEANTIAALLNRK  PQDLTEPNQ</p>
<p>SEQ ID NO: 4</p>	<p>anti-CD38-scFv fusionado con SLT-1A</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS  AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG  DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR  LIVERNNLYVTGFVNRTNNVYF  RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS  YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT  TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM  LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT  LDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN  WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRI  SFGSINAILGSVALILNCHHHASR  VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIELT  QSPSSFSVSLGDRVTITCKASEDI  YNRLAWYQKPGNAPRLLISGA  TSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLI  TSLQTEDVATYYCQQYWSTPTF  GGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG  SKVQLQESGPSLVQPSQRLSITC  TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKG  LEWLGVIWRGGSTDYNAAFMS  RLSITKDNSKSQVFFKMNSLQA  DDTAIFYCAKTLITTYAMDYW  GQGTTVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 5</p>	<p>anti-HER2-V<sub>HH</sub> fusionado con SLT-1A</p>	<p>MEVQLVESGGGLVQAGGSLRLS  CAASGITFSINTMGWYRQAPGK  QRELVALISSIGDTYYADSVKGR  FTISRDNANTVYLQMNLSKPE  DTAVYYCKRFRRTAAQGTDYWG  QGTQVTVSSAHHSEDPSKAPK  APKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIR  SAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGS  GDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNL  RLIVERNNLYVTGFVNRTNNVYF  YRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDS  SYTTLQRVAGISRTGMQINRHSL  TTSYLDLMSHSGTSLTQSVARA  MLRFVTVTAEALRFRQIQRGFR  TLDLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL  NWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVG  RISFGSINAILGSVALILNCHHHA  SRVAR</p>

## REIVINDICACIONES

1. Proteína citotóxica, que comprende:

a) una región de unión de tipo inmunoglobulina:

- (i) que comprende uno o más de: fragmento de anticuerpo de dominio único, fragmento variable de cadena única, fragmento variable de anticuerpo, fragmento de unión a antígeno y fragmento Fd; y  
(ii) capaz de unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular;

y

b) un polipéptido efector de Subunidad A de toxina Shiga citotóxica, que comprende:

una secuencia de aminoácidos que es al menos 85% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;

o una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

(i) aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;

(ii) aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3;

(iii) aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; y

(iv) aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3;

en la que, tras la administración de la proteína citotóxica a una célula físicamente acoplada con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte de la célula.

2. Proteína citotóxica, según la reivindicación 1, en la que, tras la administración de la proteína citotóxica a una primera población de células cuyos miembros están físicamente acoplados a biomoléculas diana extracelulares de la región de unión de tipo inmunoglobulina, y una segunda población de células cuyos miembros no están acoplados físicamente a ninguna biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina, un efecto citotóxico de la proteína citotóxica a los miembros de dicha primera población de células con respecto a los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor.

3. Proteína citotóxica, según la reivindicación 2, en la que dicha primera población de células está acoplada físicamente con dicha biomolécula diana extracelular por medio de interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan la biomolécula diana extracelular, o una parte de la misma, al exterior de una célula; o en la que dicha biomolécula diana extracelular es una proteína de membrana integral o proteína de membrana periférica expresada por la célula o la primera población de células.

4. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina es capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EphB2, antígeno de membrana específico de la próstata, Cripto, endoglina, proteína activada por fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, EpCAM, gpA33, mucina, TAG-72, anhidrasa carbónica IX, proteína de unión a folato, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido Lewis-Y2, VEGFR, Alfa Vbeta3, Alfa5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANKL, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, beta-catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus de Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfa-fetoproteína, 17-A1, antígeno de tumor de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, FcεRIa, galectina-9, mmp-14, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, cD11a-c, GITRL, molécula MHC Clase II, CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2, y cualquier fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores.

5. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el polipéptido efector de la toxina Shiga citotóxica comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre:

(i) aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;

(ii) aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3;

(iii) aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; y

(iv) aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

6. Proteína citotóxica, según la reivindicación 4, en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos 269-508 de la SEQ ID NO: 4;

o en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende la secuencia de aminoácidos 1-119 de la SEQ ID NO: 5, tal como en la que la proteína citotóxica comprende la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO: 5.

7. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el polipéptido efector de la toxina Shiga citotóxica comprende una mutación relativa a una Subunidad A de origen natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia la actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga mientras se retiene

una actividad citotóxica; en la que la mutación se selecciona de eliminación o sustitución de al menos un residuo de aminoácido.

5 8. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en forma de un homomultímero o heteromultímero.

9. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en forma de una sal o solvato farmacéuticamente aceptable.

10 10. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, conjugada con un agente de diagnóstico.

11. Composición farmacéutica que comprende una proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

15 12. Polinucleótido capaz de codificar una proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o un complemento del mismo.

13. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 12.

20 14. Célula huésped transformada que comprende un polinucleótido, según la reivindicación 12, o un vector de expresión según la reivindicación 13.

15. Procedimiento *in vitro* para eliminar una célula, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

25 16. Procedimiento *in vitro* para marcar el interior de una célula cancerosa o una célula inmunitaria, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una proteína citotóxica, según la reivindicación 10.

30 17. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, o una composición farmacéutica, según la reivindicación 11, para usar en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente.

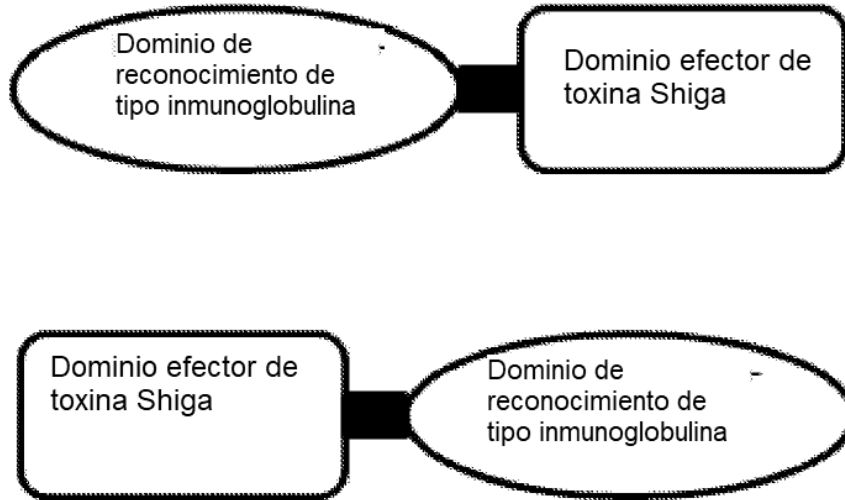
18. Proteína citotóxica o composición farmacéutica para usar, según la reivindicación 17, en la que el tratamiento es de una enfermedad, trastorno o afección seleccionada del grupo que consiste en: cáncer, tumor, trastorno inmunitario e infección microbiana;

35 tal como, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hematológico, cáncer renal-tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer uterino;

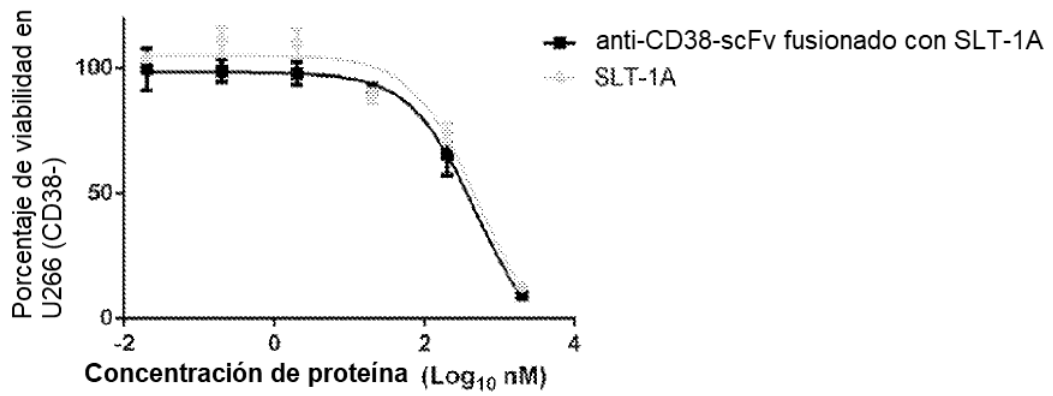
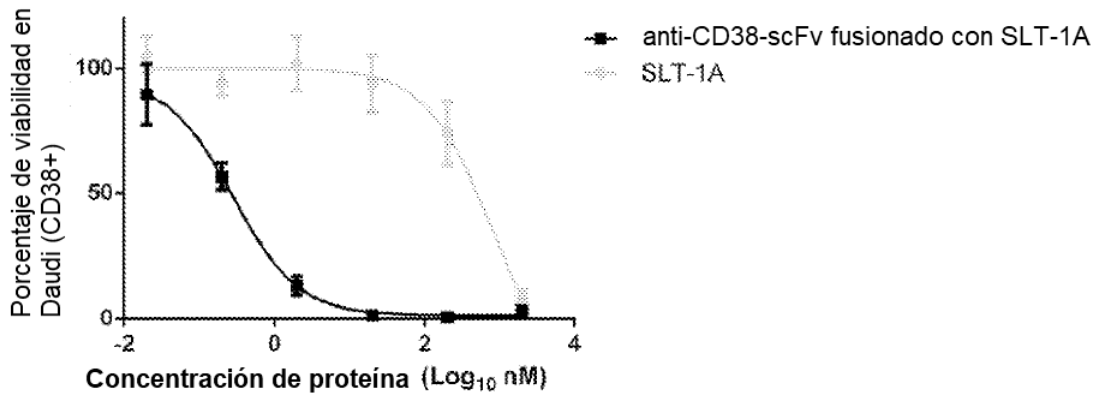
40 o en la que el trastorno inmunitario está asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, shock séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa y vasculitis.

45

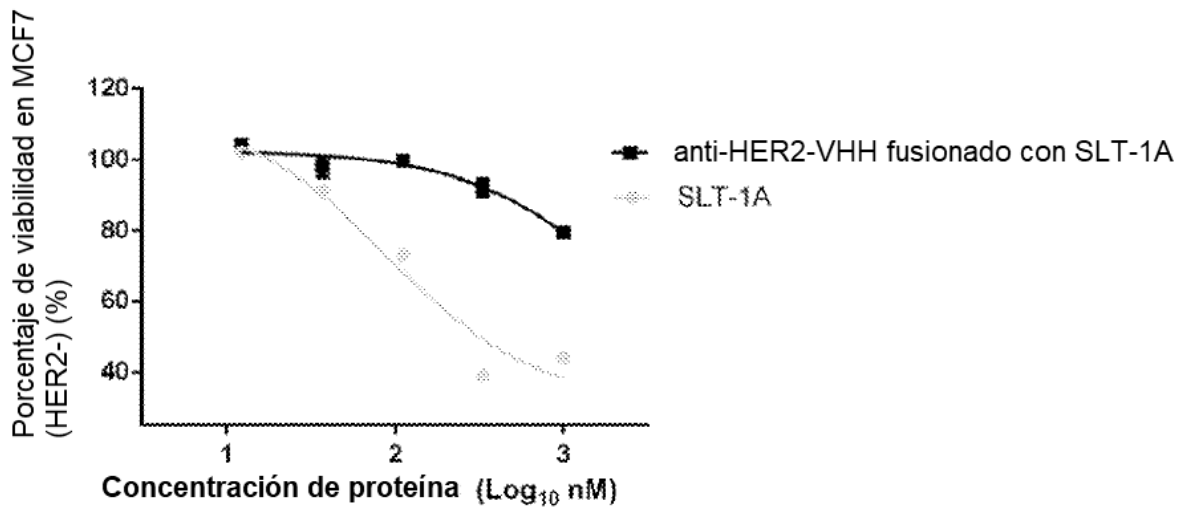
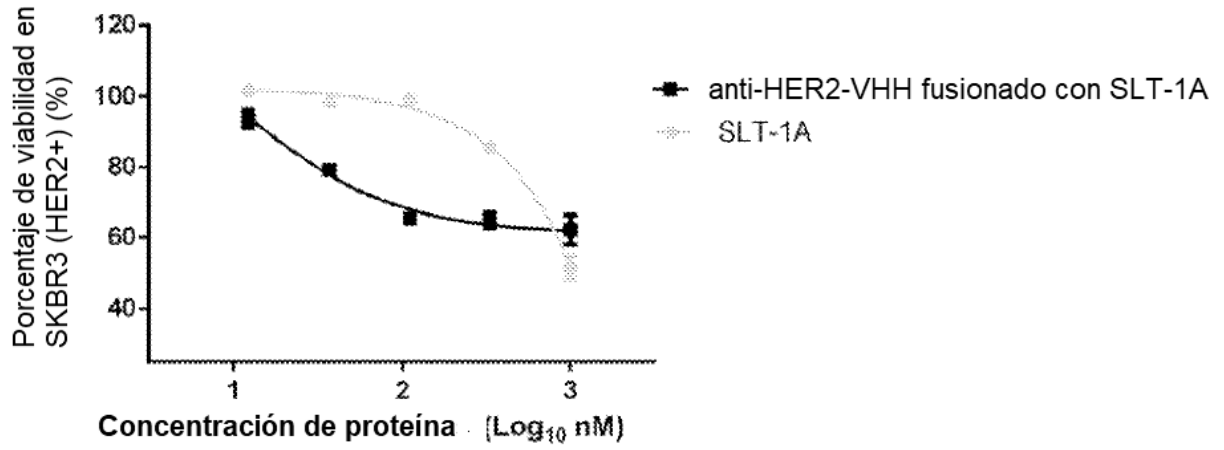
**Figura 1.** Dibujo esquemático de la arquitectura general de proteínas citotóxicas de ejemplo



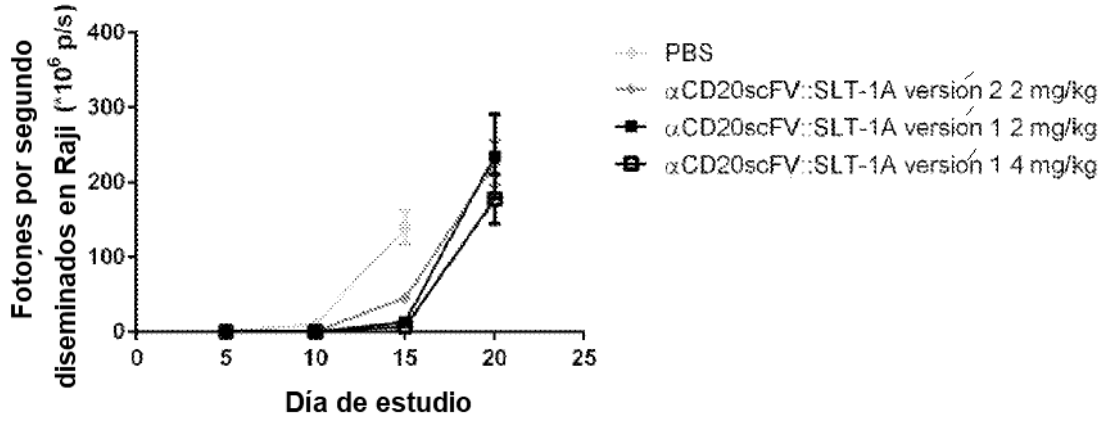
**Figura 2. Citotoxicidad dirigida:** alfaCD38-scFv fusionada con STL-1A mostró citotoxicidad específica del tipo de célula diana a células positivas de CD38



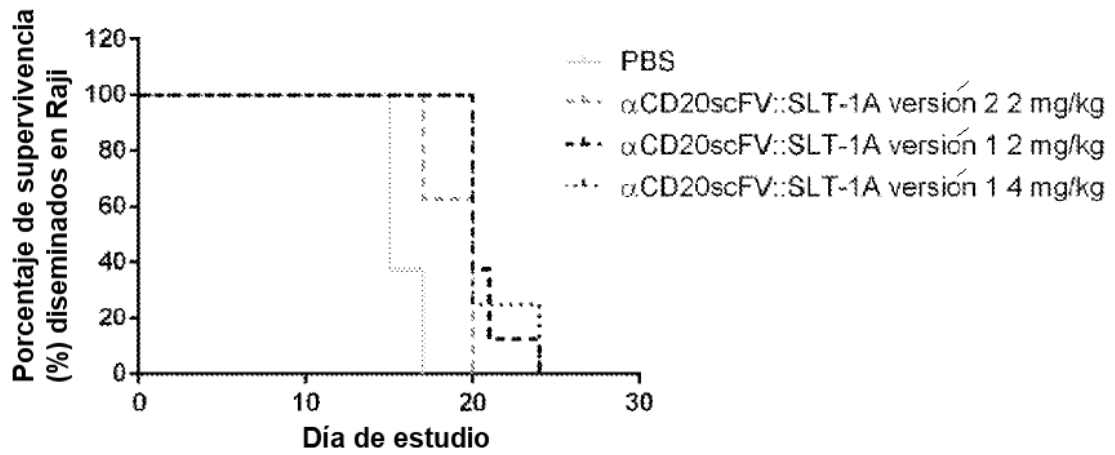
**Figura 3. Citotoxicidad dirigida:** alfaHER2-VHH fusionado con SLT-1A mostró citotoxicidad específica de tipo de célula a células positivas HER2



**Figura 4. Resultados en xenoinjerto de tumor diseminado.** alfaCD20-scFv fusionado con proteínas citotóxicas SLT-1A redujo los volúmenes de tumores diseminados *in vivo*

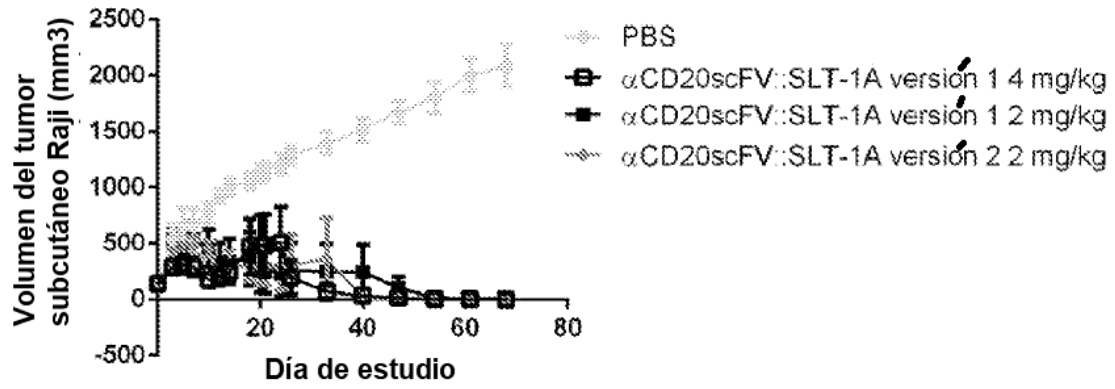


**Figura 5. Resultados de xenoinjertos de tumores diseminados.** alfaCD20-scFv fusionado con proteínas citotóxicas SLT-1A extendió la esperanza de vida

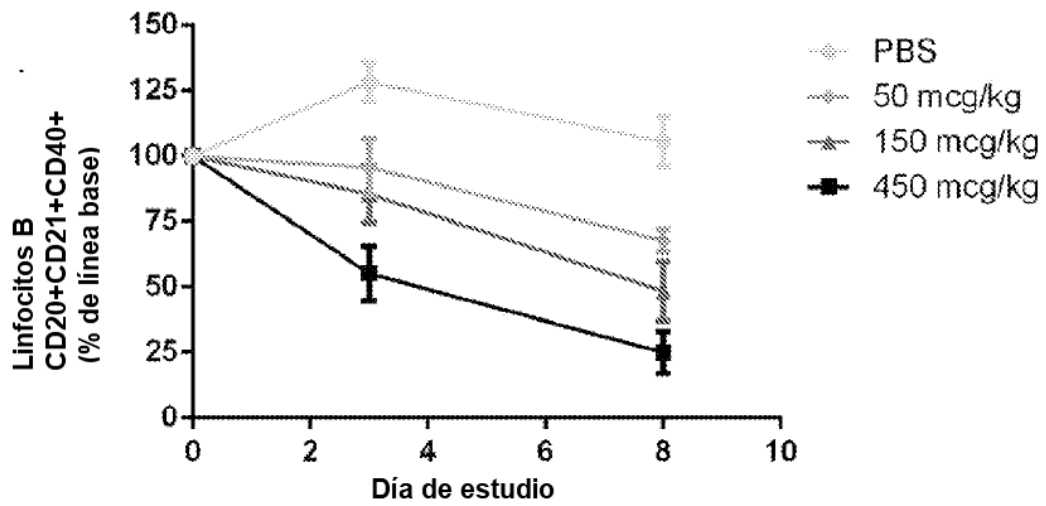




**Figura 6. Resultados de xenoinjertos subcutáneos:** la mayoría de los ratones mostraron una regresión completa del volumen del tumor antes del día 54



**Figura 7. Resultados en primates no humanos:** Después de la administración parenteral de alfaCD20-scFv fusionado con SLT-1A, se observó un agotamiento con el tiempo dependiente de la dosis de células B de sangre periférica



**Figura 8. Resultados en primates no humanos:** Después de la administración parenteral de una proteína de unión a CD-20 de ejemplo, se observó un agotamiento con el tiempo dependiente de la dosis de células B de sangre periférica

