

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 729**

51 Int. Cl.:

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/20 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2015 PCT/US2015/019708**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138452**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2015 E 15712229 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3116904**

54 Título: **Proteínas que comprenden regiones efectoras de la subunidad A de la toxina Shiga próximas al extremo amino terminal y regiones de unión de tipo inmunoglobulina de reconocimiento celular capaces de unirse específicamente a HER2/neu/ErbB2**

30 Prioridad:
11.03.2014 US 201461951121 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.03.2021

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

72 Inventor/es:
**POMA, ERIC y
WILLERT, ERIN**

74 Agente/Representante:
SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 809 729 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 que comprenden regiones efectoras de la subunidad A de la toxina Shiga próximas al extremo amino terminal y regiones de unión de tipo inmunoglobulina de reconocimiento celular capaces de unirse específicamente a HER2/neu/ErbB2

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a proteínas citotóxicas que comprenden regiones de unión de tipo inmunoglobulina para mediar en el reconocimiento celular y regiones efectoras de la toxina Shiga que se combinan de tal manera que las regiones efectoras de la toxina Shiga efectoras son próximas a los extremos amino terminales de las proteínas citotóxicas, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas de la presente invención tienen usos, por ejemplo, para la eliminación selectiva de tipos celulares específicos, el suministro de materiales exógenos dentro de las células diana, el marcaje de los compartimentos subcelulares de las células diana y como moléculas terapéuticas para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluidos cánceres, tumores, trastornos inmunes e infecciones microbianas.

ANTECEDENTES

El desarrollo de proteínas de fusión sintéticas a partir de las toxinas que son eficaces como agentes terapéuticos ha desafiado a los científicos durante décadas (Pastan I et al, Annu Rev Med. 58: 221-37 (2007)). Un obstáculo es que los restos de toxina enzimáticos de proteínas citotóxicas sintéticas derivados de las toxinas bacterianas y de plantas deben llegar a sus sustratos diana citosólicos con el fin de eliminar las células. Para muchas proteínas citotóxicas recombinantes, la potencia de la citotoxicidad depende de la eficacia de la molécula en el direccionamiento intracelular (Pirie C et al, J Biol Chem 286: 4165-72 (2011)); sin embargo, la comprensión de cómo las toxinas dirigen su propio transporte intracelular desde los endosomas al citosol sigue siendo un reto para la investigación científica (Antignani A, D Fitzgerald, Toxinas 5: 1486-502 (2013)).

Muchas proteínas contienen secuencias de polipéptidos conservadas llamadas dominios que forman unidades plegadas autocontenidas de estructura de proteína que pueden funcionar independientemente de la proteína completa o cuando se recombinan en una proteína ortóloga (Kirshner M, Gerhart J, Proc Natl Acad Sci USA 95: 8420-7 (1988)). El uso de dominios de proteínas modulares en la creación de nuevas proteínas ofrece posibilidades casi ilimitadas (Nixon A et al., Proc Natl Acad Sci USA 94: 1069-73 (1997)). Una posibilidad es la ingeniería molecular de moléculas quiméricas compuestas de dominios de reconocimiento y dominios de toxina proteica. Las toxinas de origen natural o los fragmentos de toxinas truncadas se han unido o fusionado a dominios de inmunoglobulina o ligandos receptores mediante conjugación química o técnicas de ingeniería de proteínas recombinantes con la esperanza de crear moléculas terapéuticas dirigidas a células (Moolten F, Cooperband S, Science 169: 68-70 (1970); Thorpe P et al., Nature 271: 752-5 (1978); Krolick K et al., Proc Natl Acad Sci USA 77: 5419-23 (1980); Krolick K et al., Cancer Immunol Immunother 12: 39-41 (1981); Blythman H et al., Nature 290: 145-46 (1981); Chaudhary V et al., Nature 339: 394-7 (1989); Strom T et al., Semin Immunol 2: 467-79 (1990); Pastan I y col., Annu Rev Biochem 61: 331-54 (1992); Foss F y col., Curr Top Microbiol Immunol 234: 63-81 (1998)). Un objetivo de dicha ingeniería molecular es diseñar moléculas quiméricas con la doble funcionalidad de: 1) administrar toxinas a tipos o lugares celulares específicos dentro de un organismo después de la administración sistémica; y 2) efectuar una citotoxicidad dirigida a células específicas usando mecanismos potentes de citotoxicidad efectivos 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 Slt-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)). Por ejemplo, Stx, SLT-1 y SLT-2 muestran actividad enzimática indistinguible en sistemas libres de células (Head S et al, J Biol Chem. 266: 3617-21 (1991); Tesh V et al, Infect Immun 61: 3392-402 (1993); Brigotti M et al, Toxicon 35: 1431-1437 (1997)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga contienen dominios de reconocimiento que se unen preferentemente a un glicosfingolípido 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)₅ 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)₅ 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 y SLT-1A) 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)).

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)). Una toxina A-B inactivadora de ribosomas puede paralizar de forma permanente un ribosoma tras otro dentro de 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)). La eficiencia catalítica de esta reacción enzimática (K_{cat}/Km) está cerca del límite de difusión (Jasheway K et al, *Toxins.* 3: 1233-1248 (2011)). Se cree que una sola molécula de la 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 tóxica 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 las 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 de tipo inmunoglobulina dirigida a células que sea capaz de eliminar específica y selectivamente un tipo de célula diana.

La potencia citotóxica de una construcción de toxina Shiga depende de su eficacia en alcanzar el citosol (Tam, *Microbiología* 153: 2700-10 (2007)); sin embargo, la comprensión actual de los mecanismos moleculares de enrutamiento de toxinas al citosol sigue siendo un desafío para la investigación científica (Antignani, *Toxins* 5: 1486-502 (2013)). Al-Jaufy, et al., *Infection and Immunity*, 62 (3): 956-960 (1994), describe la citotoxicidad de una proteína de fusión subunidad A de toxina Shiga-CD4 a las células infectadas por el virus de inmunodeficiencia humana; Roudkenar, et al., *Cell Biology and Toxicology*, 22 (3): 213-219 (2006) describe la citotoxicidad selectiva de la proteína STXA₁-GM-CSF recombinante en células de cáncer hematopoyético; Pastan, et al., *Annual Review of Medicine* 58: 221-237 (2007), describe el tratamiento con inmunotoxina sdel cáncer; Pai-Scherf, et al., *Clinical Cancer Research*, 5: 2311-2315 (1999), describe la hepatotoxicidad en pacientes con cáncer que reciben erb-38, una inmunotoxina recombinante que se dirige al receptor erbB2. Sería deseable tener proteínas citotóxicas dirigidas a las células que comprendan regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga que autodirijan su propio enrutamiento intracelular y muestren una citotoxicidad potente para usos que implican la eliminación dirigida de tipos celulares específicos y para su uso como agente terapéutico en el tratamiento de una variedad de enfermedades, tales como, por ejemplo, cánceres, tumores, trastornos inmunes e infecciones microbianas. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad en la técnica de formas de diseñar proteínas citotóxicas que comprendan regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga que retengan las funciones efectoras de la toxina, tales como el enrutamiento intracelular autodirigido y la citotoxicidad, después de unirse a regiones de unión de polipéptidos heterólogos para reconocimiento celular.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona varias proteínas que comprenden 1) regiones de unión de tipo inmunoglobulina, tal como de inmunoglobulinas, tal como se define en las reivindicaciones y 2) regiones efectoras de toxina Shiga, tal como de SLT1A, tal como se define en las reivindicaciones. La unión de las regiones de unión de tipo inmunoglobulina con regiones de polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga permitió el diseño del reconocimiento específico de tipo celular de la citotoxicidad de la toxina Shiga, y la citotoxicidad fue mayor cuando estas dos regiones se combinaron de manera que las regiones de unión de tipo inmunoglobulina no estaban próximas en relación con las regiones de toxina Shiga a los extremos amino terminales de las proteínas. Las proteínas de la invención tienen usos tales como, por ejemplo, la eliminación de células específicas, el suministro de materiales exógenos, como agentes de diagnóstico y como moléculas terapéuticas para el tratamiento de una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, que incluyen cánceres, tumores, anomalías de crecimiento, trastornos inmunes e infecciones microbianas.

Una proteína de la presente 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 la toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la Subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga,

tal como se define en las reivindicaciones; en la que dicha región de unión de tipo inmunoglobulina y dicha región efectora de toxina Shiga están dispuestas u orientadas físicamente dentro de la proteína citotóxica de modo que la región de unión tipo inmunoglobulina no se encuentra próxima al extremo amino terminal de la región efectora de toxina Shiga.

5 Una proteína de la presente 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 la toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la Subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga, tal como se define en las reivindicaciones; en la que dicha región de unión de tipo inmunoglobulina y dicha región efectora de toxina Shiga están dispuestas u orientadas físicamente dentro de la proteína citotóxica de tal manera que la región de unión tipo inmunoglobulina no se encuentra próxima al extremo amino terminal de la proteína con respecto a la región efectora de toxina Shiga.

15 En ciertas realizaciones adicionales, la proteína de la presente 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 toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la Subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga, tal como se define en las reivindicaciones; en la que dicha región de unión de tipo inmunoglobulina y dicha región efectora de toxina Shiga están dispuestas u orientadas físicamente dentro de la proteína citotóxica de tal manera que la región efectora de toxina Shiga se encuentra próxima al extremo amino terminal de la proteína.

25 Para ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: fragmento de anticuerpo de un solo dominio (sdAb), Nanobody®, dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un camélido (fragmento V_HH), dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un pez cartilaginoso, nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento V_{NAR}, fragmento variable de cadena única (scFv), fragmento variable de anticuerpo (Fv), un fragmento de región determinante complementaria 3 (CDR3), polipéptido FR3-CDR3-FR4 (FR3-CDR3-FR4) restringido, fragmento Fd, dominio inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP™), fragmento de unión a antígeno (Fab), dominio tipo III de la ^{10a} fibronectina derivada de fibronectina (10Fn3) (por ejemplo, monocuerpo), dominio de tenascina tipo III (por ejemplo, TNfn3), dominio de motivo de repetición de anquirina (ARD), dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad (dominio A de LDLR o LDLR-A), lipocalina (anticalina), dominio Kunitz, dominio Z derivado de proteína A, dominio derivado de cristalina gamma B, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d (affitin), dominio SH2 derivado de Fyn, miniproteína, andamiaje de dominio tipo lectina tipo C, mimético de anticuerpos modificados genéticamente y cualquier homólogo manipulado genéticamente de cualquiera de los anteriores que conserven la funcionalidad de unión.

40 Para ciertas realizaciones, tras la administración de la proteína de la presente invención a una célula acoplada físicamente con la biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína, la proteína es capaz de causar la muerte de la célula. En ciertas realizaciones adicionales, tras la administración de la proteína de la invención a dos poblaciones diferentes de tipos de células que difieren con respecto a la presencia o nivel de una biomolécula diana extracelular, la proteína es capaz de causar la muerte celular de los tipos de células acoplados físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína citotóxica en una CD₅₀ que es al menos tres veces menor que la CD₅₀ observada para tipos de células que no están físicamente acopladas con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la proteína de la invención a una primera población de células cuyos miembros están físicamente acoplados a biomoléculas diana extracelulares de la región de unión de la proteína, y una segunda población de células cuyos miembros no están físicamente acoplados a ninguna biomolécula diana extracelular de la región de unión, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a la célula con respecto a los miembros de dicha primera población de células en relación con los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor. Para ciertas realizaciones, mediante las cuales la administración de la proteína de la invención a una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente a una cantidad significativa de la biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína, y una segunda población de células cuyos miembros no están acoplados físicamente a una cantidad significativa de ninguna biomolécula diana extracelular de la región de unión, el efecto citotóxico de la molécula dirigida a la célula con respecto a los miembros de dicha primera población de células en relación con los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor. Para ciertas realizaciones, tras la administración de la proteína de la invención a una primera población de células positivas de biomoléculas diana, y a una segunda población de células cuyos miembros no expresan una cantidad significativa de una biomolécula diana de la región de unión de la proteína en una superficie celular, el efecto citotóxico de la proteína para los miembros de la primera población de células en relación con los miembros de la segunda población de células es al menos 3 veces mayor.

65 En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina está diseñada o seleccionada por su capacidad para unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40,

CD74, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, antígeno de membrana específico de próstata, Cripto, CDCP1, endoglina, proteína de activación de fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, CD133, gpA33, mucina, TAG-72, receptor transmembrana de tirosina-proteína quinasa (ROR1 o NTRKR1), anhidrasa carbónica IX, proteína de unión a folato, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido Lewis-Y2, VEGFR, Alpha Vbeta3, Alpha5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, ErbB1/EGFR, Erb3, Erb3 MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANK, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4, beta-catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART-1/MelanA, gp100, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno de virus Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfafetoproteína, 17-A1, antígeno tumoral de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305; C3AR, FceRIa, galectina-9, mrp-14, ligando de muerte programada 1 (PD-L1), 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, MHC Clase I (opcionalmente completado con un péptido), molécula MHC de clase II (opcionalmente complejada con un péptido), CD284-TLR4, CD107-Mac3, CD195-CCR5, HLA-DR, CD16/32, CD282-TLR2, CD11c, CD123 y cualquier fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región efectora de la toxina Shiga derivada de aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones adicionales, la proteína de la presente invención comprende la región efectora de toxina Shiga derivada de los aminoácidos 1 a 241 de la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2 o SEQ ID N°: 3. En ciertas realizaciones adicionales, la región efectora de la toxina Shiga se deriva de los aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones adicionales, la región efectora de la toxina Shiga se deriva de los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden un motivo señal de recuperación/retención del retículo endoplasmático carboxi terminal. En ciertas realizaciones adicionales, las proteínas de la presente invención comprenden un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplasmático carboxi terminal seleccionado del grupo que consiste en: KDEL (SEQ ID NO: 32), HDEF (SEQ ID NO: 33), HDEL (SEQ ID NO: 34), RDEF (SEQ ID NO: 35), RDEL (SEQ ID NO: 36), WDEL (SEQ ID NO: 37), YDEL (SEQ ID NO: 38), HEEF (SEQ ID NO: 39), HEEL (SEQ ID NO: 40), KEEL (SEQ ID NO: 41), REEL (SEQ ID NO: 42), KAEL (SEQ ID NO: 43), KCEL (SEQ ID NO: 44), KFEL (SEQ ID NO: 45), KGEL (SEQ ID NO: 46), KHEL (SEQ ID NO: 47), KLEL (SEQ ID NO: 48), KNEL (SEQ ID NO: 49), KQEL (SEQ ID NO: 50), KREL (SEQ ID NO: 51), KSEL (SEQ ID NO: 52), KVEL (SEQ ID NO: 53), KWEL (SEQ ID NO: 54), KYEL (SEQ ID NO: 55), KEDL (SEQ ID NO: 56), KIEL (SEQ ID NO: 57), DKEL (SEQ ID NO: 58), FDEL (SEQ ID NO: 59), KDEF (SEQ ID NO: 60), KKEL (SEQ ID NO: 61), HADL (SEQ ID NO: 62), HAEL (SEQ ID NO: 63), HIEL (SEQ ID NO: 64), HNEL (SEQ ID NO: 65), HTEL (SEQ ID NO: 66), KTEL (SEQ ID NO: 67), HVEL (SEQ ID NO: 68), NDEL (SEQ ID NO: 69), QDEL (SEQ ID NO: 70), REDL (SEQ ID NO: 71), RNEL (SEQ ID NO: 72), RTDL (SEQ ID NO: 73), RTEL (SEQ ID NO: 74), SDEL (SEQ ID NO: 75), TDEL (SEQ ID NO: 76), SKEL (SEQ ID NO: 77), STEL (SEQ ID NO: 78) y EDEL (SEQ ID NO: 79).

En ciertas realizaciones adicionales, la proteína de la presente descripción comprende la región de unión que comprende o que consiste esencialmente de los aminoácidos 269-508 de cualquiera de las SEQ ID NOs: 4-19.

En ciertas realizaciones, la proteína de la presente descripción comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 4-31.

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención comprenden una región efectora de la toxina Shiga que comprende 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 la toxina Shiga, en donde la mutación se selecciona de al menos una eliminación, inserción o sustitución de residuos de aminoácidos que reduce o elimina la citotoxicidad de la región de la toxina Shiga, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones adicionales, la proteína comprende una mutación que reduce o elimina la actividad catalítica pero retiene otras funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como, por ejemplo, promover la internalización celular y/o dirigir el enrutamiento intracelular. En ciertas realizaciones, la mutación se selecciona de al menos una sustitución de residuo de aminoácido, tal como, por ejemplo, A231E, R75A, Y77S, Y114S, E167D, R170A, R176K y/o W203A en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de la presente invención y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se define en las reivindicaciones; y el uso de dicha proteína o una composición que la comprende, tal como se describe adicionalmente en este documento. Ciertas realizaciones de la presente invención son composiciones farmacéuticas que comprenden cualquier proteína de la presente invención y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como se define en las reivindicaciones.

Entre ciertas realizaciones de la presente descripción está una composición de diagnóstico que comprende una proteína de la invención comprende además un agente promotor de la detección para la recogida de información, tal como información útil para el diagnóstico de un tipo de célula, tejido, órgano, enfermedad, trastorno, condición y/o paciente.

5 Más allá de las proteínas de la presente invención y composiciones de las mismas, los polinucleótidos capaces de codificar una proteína de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, están dentro del alcance de la presente invención, así como vectores de expresión que comprenden un polinucleótido de la invención y células huésped que comprenden un vector de expresión de la invención. Las células huésped que comprenden un vector de expresión pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos para producir una proteína de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, o un componente de polipéptido o fragmento del mismo mediante expresión recombinante.

15 La descripción también incluye un sistema para conferir una mejor citotoxicidad a una proteína que 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 y (b) una región efectora de toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la Subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga; comprendiendo el sistema la etapa de disponer dicha región de unión de tipo inmunoglobulina de forma próxima al extremo carboxi terminal de dicha región efectora de toxina Shiga dentro de la proteína. La descripción también incluye un sistema para conferir citotoxicidad mejorada a una proteína que comprende (a) una región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende uno o más polipéptidos y es capaz de unirse específicamente al menos a una biomolécula diana extracelular y (b) una región efectora de toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la Subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga; comprendiendo el sistema la etapa de disponer dicha región de unión de tipo inmunoglobulina de forma próxima al extremo carboxi terminal de la proteína con respecto a dicha región efectora de toxina Shiga. La descripción también incluye un sistema para conferir citotoxicidad mejorada a una proteína que comprende (a) una región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende uno o más polipéptidos y es capaz de unirse específicamente al menos a una biomolécula diana extracelular y (b) una región efectora de toxina Shiga que comprende un polipéptido derivado de la secuencia de aminoácidos de la Subunidad A de al menos un miembro de la familia de toxinas Shiga; comprendiendo el sistema la etapa de disponer dicha región efectora de toxina Shiga de forma próxima al extremo amino terminal de la proteína.

Adicionalmente, la presente invención proporciona procedimientos *in vitro* de eliminar una célula o células, tal como se define en las reivindicaciones, que comprende la etapa de poner en contacto una célula o células con una proteína de la invención o una composición farmacéutica que comprende una proteína de la invención, tal como se describe en las reivindicaciones. En realizaciones adicionales de los procedimientos de eliminación de células, el procedimiento es capaz de eliminar selectivamente una célula o células y/o tipos de células preferentemente sobre otra célula o células y/o tipos de células cuando se pone en contacto con una mezcla de células que difieren con respecto al nivel de presencia y/o expresión extracelular de una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína.

La presente invención proporciona además para el tratamiento de enfermedades, trastornos y/o afecciones en pacientes utilizando una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína o composición farmacéutica de la invención, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección a tratar utilizando la invención se selecciona de un cáncer o un tumor, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza-cuello, cáncer de riñón-tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer de útero. En ciertas realizaciones de la descripción, un trastorno inmunitario a tratar es un trastorno inmunitario asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa, y vasculitis.

El uso de cualquier composición de la presente invención para el tratamiento o prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento y/o trastorno inmunitario está dentro del alcance de la presente descripción. Entre ciertas realizaciones de la presente invención está una proteína de la presente invención y/o una composición farmacéutica de la misma para usar en el tratamiento o la prevención de un cáncer o un tumor tal como se define en las reivindicaciones. Entre ciertas realizaciones de la presente descripción está el uso de una proteína de la presente invención y/o composición farmacéutica de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario o infección microbiana.

Ciertas realizaciones de las proteínas de la invención pueden utilizarse para el suministro de material exógeno adicional en una célula acoplada físicamente con una biomolécula diana extracelular de la proteína de la

invención. Adicionalmente, la presente descripción proporciona un procedimiento para el suministro de material exógeno al interior de una célula o células que comprende poner en contacto la célula o células, ya sea *in vitro* o *in vivo*, con una proteína, composición farmacéutica y/o composición de diagnóstico de la presente invención. La presente descripción proporciona además un procedimiento para la liberación de material exógeno al interior de una célula o células en un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente una proteína de la presente invención (con o sin actividad citotóxica), en el que la célula o células diana están acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la proteína.

El uso de cualquier composición de la presente invención para el diagnóstico, pronóstico y/o caracterización de una enfermedad, trastorno y/o afección está dentro del alcance de la presente descripción. Entre ciertas realizaciones de la presente descripción se encuentra un procedimiento para usar una proteína de la invención que comprende un agente promotor de detección y/o composición de la descripción (por ejemplo, una composición de diagnóstico) para la recopilación de información útil en el diagnóstico, pronóstico o caracterización de una enfermedad, trastorno o afección. Entre ciertas realizaciones de la presente descripción está el procedimiento para detectar una célula usando una proteína y/o composición de diagnóstico de la descripción que comprende las etapas de poner en contacto una célula con la proteína y/o composición de diagnóstico y detectar la presencia de dicha molécula y/o composición diagnóstica dirigida a la célula. En ciertas realizaciones de la descripción, la etapa de poner en contacto la célula o células tiene lugar *in vitro*. En ciertas realizaciones de la descripción, la etapa de poner en contacto la célula o células tiene lugar *in vivo*. En ciertas realizaciones de la descripción, la etapa de detectar la célula o células tiene lugar *in vitro*. En ciertas realizaciones de la descripción, la etapa de detectar la célula o células tiene lugar *in vivo*. En ciertas realizaciones adicionales de la descripción, el procedimiento implica la detección de la ubicación de la proteína en un organismo usando uno o más procedimientos de formación de imágenes después de la administración de la proteína a dicho organismo. Por ejemplo, las proteínas de la descripción que incorporan agentes promotores de detección, tal como se describe en el presente documento, pueden usarse para caracterizar enfermedades como potencialmente tratables por una composición farmacéutica relacionada de la invención. Por ejemplo, ciertos compuestos (por ejemplo, proteínas) de la invención, composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas y composiciones de diagnóstico) de la invención, y procedimientos de descripción pueden usarse para determinar si un paciente pertenece a un grupo que responde a una composición farmacéutica de la invención.

Entre ciertas realizaciones de la presente descripción están kits que comprenden una composición de materia de la invención, y opcionalmente, instrucciones de uso, reactivo o reactivos adicionales, y/o dispositivo o dispositivos de administración farmacéutica.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **figura 1** muestra la disposición general de las proteínas de la invención con "N" y "C" que indican un extremo amino terminal y carboxi terminal, respectivamente, de la proteína o un componente polipeptídico de la proteína que comprende la región efectora de la toxina Shiga.

La **Figura 2** muestra gráficamente que SLT-1A:: α CD38scFv exhibió una citotoxicidad mejorada en comparación con la orientación inversa α CD38scFv::SLT-1A. El porcentaje de viabilidad de las células se trazó sobre el logaritmo en base 10 de la concentración de proteína citotóxica.

La **Figura 3** muestra gráficamente una citotoxicidad específica de tipo de célula diana mejorada de la proteína SLT-1A:: α HER2scFv en comparación con la proteína de orientación inversa α HER2scFv::SLT-1A. El porcentaje de viabilidad de las células se trazó sobre el logaritmo en base 10 de la concentración de proteína citotóxica.

La **Figura 4** muestra imágenes de microscopía de la localización subcelular de α HER2scFv::SLT-1A y SLT-1A:: α HER2scFv. Las imágenes muestran que ambas proteínas citotóxicas entraron en las células diana dentro de una hora de la administración.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se describe más completamente en lo sucesivo usando realizaciones ilustrativas, no limitantes, y las referencias a las figuras adjuntas. La presente invención puede, sin embargo, realizarse de muchas formas diferentes y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas a continuación. Más bien, estas realizaciones se proporcionan para que esta descripción sea exhaustiva y transmita el alcance de la invención a los expertos en la técnica.

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

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

5 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).

10 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).

15 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.

20 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 componen físicamente un polipéptido. Una "proteína" es una macromolécula que comprende uno o más polipéptidos o "cadenas" de polipéptido. Un "péptido" es un pequeño polipéptido de tamaño de menos de un total de 15-20 residuos de aminoácidos. El término "secuencia de aminoácidos" se refiere a una serie de aminoácidos o residuos de aminoácidos que comprenden físicamente un péptido o polipéptido dependiendo de la longitud. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de polipéptidos y proteínas descritas en este documento se escriben de izquierda a derecha representando su orden de un extremo amino terminal a un extremo carboxi terminal.

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

35 Tabla A: Nomenclatura de aminoácidos

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

40 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)).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "expresado", "que expresa", o "expresa", y las variantes

gramaticales de los mismos, se refieren a la traducción de un polinucleótido o ácido nucleico en un polipéptido o proteína. Los polipéptidos o proteínas expresadas pueden permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o secretarse en un espacio extracelular.

5 Tal como se usa en el presente documento, las células que expresan una cantidad significativa de una biomolécula diana extracelular al menos una superficie celular son "células positivas diana" o "células diana+" y son células acopladas físicamente a la biomolécula diana extracelular especificada.

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

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

20 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.

25 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.

30 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.

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

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

60 La eficacia y la potencia de las inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina como moléculas citotóxicas están influenciadas por la densidad de su antígeno o antígenos diana sobre una superficie de células diana (véase, por ejemplo Deckert T et al, Blood 103: 2718-26 (2004); Du X et al, Blood 111: 338-43 (2008); Baskar S et al, mAbs 4: 349-61 (2012)), ubicación del epítipo (Pulse O et al, J Immunol 141: 4410-7 (1988); Godal A et al, en J Cancer 52: 631-5 (1992); Yazdi P et al, Cancer Res. 55: 3763-71 (1995)), velocidad de internalización de la molécula citotóxica

unida a la superficie (ver por ejemplo, Du X et al, Cancer Res 68: 6300-5 (2008)), y el itinerario intracelular (Tortorella L et al, PLoS One. 7: e47320 (2012)).

La representación de la superficie celular y/o la densidad de una biomolécula diana extracelular determinada puede influir en las aplicaciones para las que pueden utilizarse más adecuadamente ciertas proteínas de la presente invención. Las diferencias en la representación de la superficie celular y/o la densidad de una biomolécula diana determinada entre las células pueden alterar la internalización y/o la citotoxicidad de una proteína determinada de la invención, tanto cuantitativa como cualitativamente. La representación de la superficie celular y/o la densidad de una biomolécula diana determinada pueden variar mucho entre las células positivas de la biomolécula diana o incluso en la misma célula en diferentes puntos en el ciclo celular o la diferenciación celular. La representación de la superficie celular total de una biomolécula diana determinada en una célula particular o población de células se puede determinar usando procedimientos conocidos para el experto, tales como procedimientos de citometría de flujo de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

15 Introducción

La presente invención resuelve los problemas para el diseño de proteínas potencialmente citotóxicas, que comprenden regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga unidas a regiones de unión heterólogas para el reconocimiento celular, tal como se define en las reivindicaciones, por ejemplo proteínas de fusión que retienen funcionalidades efectoras robustas de toxina Shiga, como el enrutamiento intracelular autodirigido hacia el citosol y la citotoxicidad. La presente invención se basa en la observación de que una relación estructural particular entre la región de toxina derivada de la subunidad A de la toxina Shiga y una región de unión heteróloga puede afectar la efectividad de la eliminación celular para proteínas citotóxicas basadas en la toxina Shiga diseñadas. El enrutamiento intracelular de estos polipéptidos debe ser suficiente para permitir que los polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga, enzimáticamente activos, lleguen de manera eficiente al compartimento citosólico e inactiven los ribosomas para causar la muerte celular. Tal como se describe con más detalle en los Ejemplos, tener la región de toxina derivada de la Subunidad A de la toxina Shiga orientada proximal al extremo terminal amino en relación con una región de unión de reconocimiento celular heteróloga dio como resultado resultados una eliminación celular significativamente más robusta que los restos idénticos dispuestos en la orientación opuesta. La presente invención proporciona una forma específica de diseñar tales proteínas citotóxicas para lograr esto mediante la disposición de la región de unión de reconocimiento celular de forma próxima al extremo carboxi terminal de la región efectora de la toxina Shiga dentro de la proteína citotóxica. La unión de las regiones de unión de reconocimiento celular heterólogas con las regiones de la subunidad A de la toxina Shiga en esta orientación específica permitió el diseño de un reconocimiento específico del tipo de células más potente de la citotoxicidad de la toxina Shiga, así como proteínas con enrutamiento intracelular deseable al retículo endoplásmico y/o el citosol.

Anteriormente, se observó que las construcciones de fusión de subunidad A de la toxina Shiga eran citotóxicas y presumiblemente capaces de autodirigir su propio direccionamiento intracelular para la liberación de un fragmento de toxina enzimáticamente activo al citosol (Al-Jaufy, Infect Immun 62: 956-60 (1994); Al-Jaufy, Infect Immun 63: 3073-8 (1995); Su, Protein Expr Purif 66: 149-57 (2009)). Cuando se crearon múltiples proteínas citotóxicas y se ensayaron con las regiones derivadas de toxina Shiga unidas a regiones de reconocimiento derivadas de inmunoglobulina en sus extremos amino terminales, estas proteínas diseñadas no mostraron los niveles esperados de citotoxicidad (ver, Ejemplos, a continuación). Sin embargo, estas proteínas de citotoxicidad reducida exhibieron unión y entrada celular así como actividades enzimáticas similares *in vitro* y afinidades de unión en comparación con variantes más citotóxicas con las mismas regiones de polipéptido unidas en una configuración diferente (véase, Ejemplos, a continuación).

Tal como se describe adicionalmente en los Ejemplos, la citotoxicidad de proteínas citotóxicas basadas en la subunidad A de la toxina Shiga se mejoró cambiando la orientación de tal manera que la región de unión de tipo inmunoglobulina se unió a regiones carboxi-proximales de la región de toxinas Shiga. Sin embargo, la orientación del diseño no alteró ni la actividad catalítica de la región derivada de toxina Shiga ni la cinética de unión de la región de unión de tipo inmunoglobulina. La sensibilidad de la citotoxicidad (y el enrutamiento intracelular) de las proteínas basadas en la toxina Shiga a la orientación que diseña sus componentes polipeptídicos es inesperada y permanece sin explicación. Estos resultados no pudieron explicarse por las diferencias en las características de unión a la diana de las proteínas, las características de unión celular o las actividades catalíticas.

I. La estructura general de las proteínas de la invención.

La presente invención proporciona varias proteínas citotóxicas, 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 la toxina Shiga para la internalización celular, enrutamiento intracelular y/o eliminación celular, 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 la toxina Shiga permite el diseño de un reconocimiento específico del tipo celular de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga. Una proteína de la invención comprende una región efectora de toxina Shiga derivada de una o más subunidades A de miembros de la familia de toxinas Shiga,

tal como se define en las reivindicaciones, unida a una región de unión de tipo inmunoglobulina que puede unirse específicamente a al menos una biomolécula diana extracelular en asociación física con una célula, tal como una biomolécula diana expresada en la superficie de una célula, en la que dicha biomolécula diana extracelular es HER2/neu/ErbB2. Esta estructura general es modular en el sentido de que cualquier cantidad de regiones de unión de tipo inmunoglobulina diversas puede unirse a regiones efectoras derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga para producir variaciones de la misma estructura general.

A. Regiones de unión de tipo inmunoglobulina

La región de unión de una proteína de la presente invención comprende 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 usa 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 se definen funcionalmente por su capacidad para unirse a moléculas diana. Las regiones de unión de tipo inmunoglobulina se derivan comúnmente de anticuerpos o estructuras similares a anticuerpos; sin embargo, se contemplan andamios 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 hebras 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 hebras. Los dominios de Ig pueden ser variables (IGV o grupo V), constante (IgC o grupo C) o intermedio (Igl o grupo I). Algunos dominios de Ig pueden estar asociados con una región determinante de la complementariedad (CDR), también llamada "región determinante de la complementariedad", que es importante para la especificidad de la unión de anticuerpos a sus epítipos. Los dominios de tipo Ig también se encuentran en proteínas no inmunoglobulinas y se clasifican sobre esa base como miembros de la superfamilia de Ig de las proteínas. El comité de nomenclatura de genes HUGO (HGNC) proporciona una lista de los miembros de la familia que contiene el dominio de tipo Ig.

Una región de unión de tipo inmunoglobulina puede ser una secuencia de polipéptido de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la secuencia de aminoácidos se ha variado de la de un anticuerpo nativo o un dominio de tipo Ig de una proteína no inmunoglobulina, por ejemplo, mediante ingeniería molecular o la selección mediante 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 inmunógenas.

Hay numerosas regiones de unión de tipo inmunoglobulina contempladas como componentes de las proteínas de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina deriva de una región de unión de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular. En ciertas otras realizaciones, 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 a 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 la complementariedad de las inmunoglobulinas, tal como se describe en el presente documento.

También hay numerosas regiones de unión derivadas de inmunoglobulina y polipéptidos diseñados no de inmunoglobulina de la técnica anterior que son útiles para el direccionamiento de polipéptidos a tipos de células específicas a través de sus características de unión de alta afinidad. En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina de las presentes proteínas se selecciona entre el grupo que incluye los dominios de anticuerpo de un solo dominio (sdAbs), nanocuerpos, dominios de anticuerpo de cadena pesada derivados de camélidos (fragmentos V_HH), nanoanticuerpos bivalentes, dominios de anticuerpos de cadena pesada derivados de peces cartilaginosos, nuevos receptores de antígenos de inmunoglobulina (IgNAR), fragmentos V_{NAR} , fragmentos variables de cadena única (scFv), fragmentos scFv multimerizantes (diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos), fragmentos scFv biespecíficos en tándem, fragmentos variables (Fv) de anticuerpos estabilizados por puente disulfuro, fragmentos de unión a antígeno (Fab) estabilizados con puentes disulfuro que consisten en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 , fragmentos divalentes $F(ab')_2$, fragmentos Fd que consisten en la cadena pesada y dominios C_H1 , minicuerpos de cadena única Fv- C_H3 , minicuerpos biespecíficos, fragmentos de dominios diméricos C_H2 (C_H2D), dominios de unión a antígeno Fc (Fcabs), fragmentos aislados de región determinante de complementariedad 3 (CDR3), región

estructural 3 restringida, CDR3, polipéptidos de región estructural 4 (FR3-CDR3-FR4), dominios inmunofarmacéuticos modulares (SMIP), fusiones scFv-Fc, fragmentos scFv multimerizantes (diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos), fragmentos variables (Fv) de anticuerpos estabilizados por puente disulfuro, fragmentos de unión a antígeno (fab) estabilizados con puentes disulfuro que consisten en los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1, nanoanticuerpos bivalentes, minicuerpos bivalentes, fragmentos bivalentes F(ab')₂ (dímeros Fab), fragmentos V_HH en tándem biespecíficos, fragmentos scFv en tándem biespecíficos, nanoanticuerpos biespecíficos, minicuerpos biespecíficos, y cualesquiera homólogos genéticamente manipulados de los anteriores que retienen su paratopo y función de unión (ver Saerens D et al, *Curr Opin Pharmacol*. 8: 600-8 (2008); Dimitrov D, *MAbs* 1: 26-8 (2009); Weiner L, *Cell* 148: 1081-4 (2012); .Ahmad Z et al, *Clin Dev Immunol* 2012: 980 250 (2012)). Hay una gran variedad de regiones que comprenden los polipéptidos derivados de las regiones constantes de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, los dominios Fc diméricos diseñados, Fcs monoméricos (mFc), scFv-Fcs, V_HH-Fcs, dominios C_H2, dominios C_H3s monoméricos (mC_H3s), dominios de inmunoglobulina sintéticamente reprogramados, y/o fusiones híbridas de dominios de inmunoglobulina con ligandos (Hofer T et al, *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 12451-6 (2008); Xiao J et al. , *J Am Chem Soc* 131: 13.616-13.618 (2009); Xiao X et al, *Biochem Biophys Res Commun* 387:387-92 (2009); Wozniak-Knopp G et al, *Protein Eng Des Sel* 23 289-97 (2010); Gong R et al, *PLoS ONE*. 7: e42288 (2012); Wozniak-Knopp G et al, *PLoS ONE* 7:.. e30083 (2012); Ying T et al, *J Biol Chem* 287: 19399-408 (2012); Ying T et al, *J Biol Chem* 288: 25154-64 (2013); Chiang M et al, *J Am Chem Soc* 136: 3370-3 (2014); Rader C, *Trends Biotechnol*. 32: 186-97 (2014); Ying T et al, *Biochimica Biophys Acta* 1844: 1977-1982 (2014)).

De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende un andamio estructural alternativo diseñado a dominios de inmunoglobulina. Los andamios estructurales alternativos diseñados son conocidos en la técnica que presentan características funcionales similares a las estructuras derivadas de inmunoglobulina, tales como de unión de alta afinidad y específica de biomoléculas diana, y pueden proporcionar características mejoradas a dominios de inmunoglobulina, tales como, por ejemplo, mayor estabilidad o inmunogenicidad reducida. Generalmente, los andamios estructurales alternativos a inmunoglobulinas tienen menos de 20 kilodaltons, consisten en una única cadena polipeptídica, carecen de residuos de cisteína, y exhiben estabilidad termodinámica relativamente alta.

Para ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la región de unión comprende un andamio estructural alternativo seleccionado de entre el grupo que incluye el 10^o 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 aftinas); dominio SH2 diseñado derivado de Fyn (Fynomers®); miniproteínas; andamios estructurales de dominio del tipo lectina de tipo C, mimético de anticuerpo manipulado y cualquier homólogo genéticamente manipulado de cualquiera de los anteriores que retienen su funcionalidad de unión (Wörn A, Plückerthun A, *J Mol Biol* 305: 989-1010 (2001); Xu L et al., *Chem Biol* 9: 933-42 (2002); Wikman M et al, *Protein Eng Des Sel* 17: 455-62 (2004); Binz H et al, *Nat Biotechnol* 23: 1257-1268 (2005); Hey T et al, *Trends Biotechnol* 23: 514-522 (2005); Holliger P, Hudson P, *Nat Biotechnol*. 23: 1126-1136 (2005); Gill D, Damle N, *Curr Opin Biotech* 17: 653-8 (2006); Koide A, Koide S, *Methods Mol Biol* 352: 95-109 (2007); Byla P et al, *J Biol Chem* 285: 12096 (2010); Zoller F et al, *Molecules* 16: 2467-85 (2011)).

Por ejemplo, han sido identificados numerosos andamios estructurales alternativos que se unen al receptor extracelular de HER2 (véase, por ejemplo Wikman M et al, *Protein Eng Des Sel*. 17: 455-62 (2004); Orlova A et al *Cancer Res* 66: 4339-8 (2006); Ahlgren S et al, *Bioconjug Chem* 19: 235-43 (2008); Feldwisch J et al, *J Mol Biol* 398: 232-47 (2010); patentes de Estados Unidos 5.578.482; 5.856.110; 5.869.445; 5.985.553; 6.333.169 ; 6.987.088; 7.019.017; 7.282.365; 7.306.801; 7.435.797; 7.446.185; 7.449.480; 7.560.111; 7.674.460; 7.815.906; 7.879.325; 7.884.194; 7.993.650; 8.241.630; 8.349.585; 8.389.227; 8.501.909; 8.512.967; 8.652.474; y la solicitud de patente 2011/0059090).

Cualquiera de las regiones de unión de tipo inmunoglobulina anteriores se puede utilizar como un componente de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, siempre que el componente de región de unión tenga una constante de disociación de 10⁻⁵ a 10⁻¹² moles/litro, preferiblemente menos de 200 nM, hacia una biomolécula diana extracelular, tal como se describe en el presente documento.

Biomoléculas diana extracelulares

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

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

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

Con respecto a la presente invención, la frase "acoplada físicamente" cuando se usa para describir una biomolécula diana significa interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan la biomolécula diana, o una parte de la misma, al exterior de una célula, tal como una pluralidad de interacciones no covalentes entre la biomolécula diana y la célula, donde la energía de cada interacción individual es del orden de aproximadamente 1-5 kilocalorías (por ejemplo, enlaces electrostáticos, enlaces de hidrógeno, interacciones de Van der Waals, fuerzas 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 biomoléculas diana extracelular de la región de unión de las proteínas de la descripción pueden incluir biomarcadores sobreproporcionalmente o exclusivamente presentes en células cancerosas, células inmunitarias y células infectadas con patógenos intracelulares, tales como virus, bacterias, hongos, priones o protozoos.

Las regiones de unión de las proteínas de la descripción pueden diseñarse o seleccionarse en base a numerosos criterios, tales como la expresión específica del tipo de célula de sus biomoléculas diana y/o la localización física de sus biomoléculas diana con respecto a tipos de células específicos. Por ejemplo, ciertas proteínas de la presente invención comprenden dominios de unión capaces de unir dianas de la superficie celular que se expresan exclusivamente por un solo tipo de células a la superficie celular.

La estructura general de las proteínas de la descripción es modular en que varias regiones de unión diversas se pueden utilizar con la misma región efectora de la toxina Shiga para proporcionar un direccionamiento diverso de varias biomoléculas diana extracelulares y por lo tanto el direccionamiento de la citotoxicidad, la citostasis, agentes de diagnóstico y/o liberación de material exógeno a varios tipos de células diversas.

B. Regiones efectoras de la toxina Shiga derivadas de subunidades A de los miembros de la familia de toxina 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 exhibir al menos una función de la toxina Shiga, tal como se define en las reivindicaciones. Las funciones de toxina Shiga incluyen, por ejemplo, entrada en la célula, deformación de la membrana lipídica, dirección del direccionamiento subcelular, evitar la degradación, inactivar catalíticamente los ribosomas, efectuar la citotoxicidad y efectuar efectos 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 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-I) aislados de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica, y variantes de toxina semejante a Shiga 2s (SLT2 o Stx2 o SLT-2) aislados de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica. SLT1 difiere por sólo un residuo de Stx, y ambos han sido referidos como Verocitotoxinas o Verotoxinas (VT) (O'Brien, Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)). Aunque las variantes SLT1 y SLT2 son sólo aproximadamente un 53-60% similares entre sí a nivel de secuencia de aminoácidos, comparten mecanismos de la actividad enzimática y la citotoxicidad comunes a los miembros de la familia de toxinas Shiga (Johannes, Nat Rev Microbiol 8: 105- 16 (2010)). Más de 39 toxinas Shiga diferentes se han descrito, tal como los subtipos definidos Stx1a, Stx1c, Stx1d y Stx2a-g (Scheutz F et al, J Clin Microbiol. 50: 2951-63 (2012)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga no se limitan, naturalmente, a ninguna especie bacteriana porque los genes que codifican la toxina Shiga pueden propagarse entre especies bacterianas a través de transferencia horizontal de genes (Strauch E et al, Infect Immun 69: 7588-95 (2001); Zhaxybayeva O., Doolittle W, Curr Biol 21: R242-6 (2011)). Como ejemplo de transferencia entre especies, se descubrió una toxina Shiga en una

5 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 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)).

10 Las regiones efectoras de la toxina Shiga de la proteína 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 de la presente invención no comprenden cualquier 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 heterólogas para efectuar el direccionamiento celular.

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

20 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)).

25 Las regiones efectoras de la toxina Shiga pueden comúnmente ser menor 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, 77 a 238 del (SEQ ID NO: 3)). Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la invención, una región efectora de la toxina Shiga derivada de SLT-1A puede comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 1. Entre otras ciertas realizaciones, una región efectora de la toxina Shiga derivada de StxA puede comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 2, 1 a 241 de SEQ ID NO: 2, 1 a 251 de SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 2. Entre otras ciertas realizaciones, una región efectora de la toxina Shiga derivada de SLT-2 puede comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 3, 1 a 241 de SEQ ID NO: 3, 1 a 251 del SEQ ID NO: 3, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 3.

30 La invención proporciona además variantes de las proteínas de la invención, en la que la región efectora de la toxina Shiga difiere de una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural hasta en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más residuos de aminoácidos (pero en no más de lo que retiene al menos 85%, 90%, 95%, 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos, tal como se define en las reivindicaciones). 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 y cuando al menos 85%, 90%, 95%, 99% o más de identidad de secuencia de aminoácidos se mantenga con respecto a una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural, tal como se define en las reivindicaciones.

35 Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la región efectora de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en secuencias de aminoácidos que tiene al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98 %, 99%, 99,5% o 99,7% de identidad de secuencia global a una subunidad A de la toxina Shiga de origen natural, tal como SLT-1A (SEQ ID NO: 1), stxA (SEQ ID NO: 2) y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3).

40 Opcionalmente, una versión de longitud total o troncada de la subunidad A de la toxina Shiga puede comprender una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones, inserciones o inversiones). En ciertas realizaciones, 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, la transfección, la infección o inducción de la célula huésped, o mediante la internalización mediada por la región de unión dirigida a célula unida con 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 la 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 176 en StxA, SLT-1A o la posición conservada equivalente en otros miembros de la familia de toxinas Shiga que normalmente se requieren para la actividad citotóxica. La capacidad de una proteína citotóxica de la invención para causar la muerte celular, por ejemplo, su citotoxicidad, se puede medir utilizando uno cualquiera o más de una serie de ensayos bien conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones de la invención, uno o más residuos de aminoácidos pueden ser mutados, insertados o suprimidos con el fin de aumentar la actividad enzimática de la región efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, la mutación de la posición del residuo de alanina-231 en Stx1A a glutamato aumentó su actividad enzimática *in vitro* (Suhan M, Hovde C, *Infect Immun* 66: 5252-9 (1998)).

En ciertas realizaciones de la invención, uno o más residuos de aminoácidos pueden ser mutados o eliminados con el fin de reducir o eliminar la actividad catalítica y/o citotóxica de la región efectora de la toxina Shiga. La actividad catalítica y/o citotóxica de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede reducirse o eliminarse por mutación o truncamiento. Las posiciones marcadas tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114, y triptófano-203 ehan demostrado ser importantes para la actividad catalítica de Stx, Stx1, y Stx2 (Hovde C et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 2568-72 (1988); Deresiewicz R et al, *Biochemistry* 31: 3272-80 (1992); Deresiewicz R et al, *Mol Gen Genet* 241: 467-73 (1993); Ohmura M et al. , *Microb Pathog* 15: 169-76 (1993); Cao C et al, *Microbiol Immunol*. 38: 441-7 (1994); Suhan, *Infect Immun* 66: 5252-9 (1998)). La mutación de ambos glutamato-167 y arginina-170 eliminó la actividad enzimática de Slt-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas libre de células (LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque utilizando la expresión *de novo* de Slt-I A1 en el retículo endoplásmico, mutando tanto glutamato-167 como arginina-170 o truncándolos a los residuos 1-239 eliminó la citotoxicidad del fragmento Slt-I A1 en ese nivel de expresión (LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)). Un análisis de truncamiento demostró que un fragmento de StxA de los residuos 75 a 268 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 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 retrotranslocarse en el citosol (LaPointe, *J Biol Chem* 280: 23310-18 (2005)).

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

Para algunas muestras, los valores exactos, ya sea para IC₅₀ o CD₅₀, podrían ser imposibles de obtener debido a la incapacidad para recoger los puntos de datos requeridos para una curva de ajuste preciso. Valores de IC₅₀ y/o CD₅₀ inexactos no deben considerarse cuando se determina la actividad de la función efectora de la toxina Shiga significativa. Datos insuficientes para adaptar con precisión una curva, tal como se describe en el análisis de los datos de ensayos de la función efectora de la toxina Shiga de ejemplo, tales como, por ejemplo, ensayos descritos en los ejemplos, no deben considerarse como representativos de la función efectora real de la toxina Shiga. Por ejemplo, en teoría, ni IC₅₀ ni CD₅₀ se pueden determinar si no se produce más del 50% de inhibición de ribosomas o muerte celular, respectivamente, en una serie de concentraciones para una muestra determinada.

El fracaso para detectar la actividad en la función efectora de la toxina Shiga puede ser debido a la expresión inadecuada, el plegamiento del polipéptido y/o la estabilidad del polipéptido en lugar de la falta de entrada celular, enrutamiento subcelular y/o actividad enzimática. Los ensayos para las funciones efectoras de la toxina Shiga pueden no requerir mucho polipéptido de la invención para medir cantidades significativas de actividad de la función efectora de la toxina Shiga. En la medida en que una causa subyacente de función efectora baja o nula se determine empíricamente para relacionarse con la expresión o la estabilidad de la proteína, un experto en la técnica puede ser capaz de compensar tales factores utilizando química de proteínas y técnicas de ingeniería molecular conocidas en la técnica, de tal manera que se puede restaurar y medir una actividad efectora funcional de la toxina Shiga. Como ejemplos, la expresión basada en células inadecuada puede ser compensada mediante el uso de diferentes secuencias de control de expresión; el plegamiento y/o estabilidad del polipéptido inadecuados se pueden beneficiar

de la estabilización de secuencias terminales, o mutaciones compensatorias en regiones no efectoras que estabilizan la estructura tridimensional de la proteína, etc. Cuando están disponibles nuevos ensayos para funciones individuales de la toxina Shiga, las regiones o polipéptidos efectores de la toxina Shiga pueden analizarse para cualquier nivel de estas funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como por estar dentro de un número determinada de veces de la actividad un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje. Ejemplos de diferencias de actividad significativas son, por ejemplo, polipéptidos efectores de la toxina Shiga que tienen 1.000 veces o 100 veces o menos la actividad de un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje; o que tienen de 3 veces a 30 veces o más actividad en comparación con un knock-down funcional o polipéptido efector de la toxina Shiga knock-out.

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

Cabe señalar que incluso si la citotoxicidad de un polipéptido efector de toxina Shiga se reduce en relación con el de tipo salvaje, en la práctica, las aplicaciones que utilizan polipéptidos efectores de la toxina Shiga pueden ser igual o más eficaces que las que utilizan polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje porque las variantes de potencia más elevada pueden exhibir efectos indeseables que se minimizan en variantes de potencia reducida. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje son muy potentes, siendo capaces de eliminar con sólo una molécula que alcanza el citosol o tal vez se internalizan 40 moléculas. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga con incluso funciones efectoras de la toxina Shiga considerablemente reducidas, tales como, por ejemplo, el direccionamiento subcelular o la citotoxicidad, en comparación con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje todavía puede ser lo suficientemente potente para aplicaciones prácticas que implican la eliminación de células diana y/o la detección de células específicas.

Para los propósitos de la presente invención, el orden específico o la orientación del efector de la toxina Shiga y regiones de unión de tipo inmunoglobulina se fija tal como se define en las reivindicaciones, de manera que la región de unión de tipo inmunoglobulina de unión está situada dentro de la proteína más próxima al extremo carboxi terminal de la región efectora de la toxina Shiga que el extremo amino terminal de la región efectora de la toxina Shiga (véase, por ejemplo, la Figura 1). En las realizaciones anteriores de proteínas de la invención, las regiones de unión, las regiones efectoras de la toxina Shiga (que pueden ser citotóxicas y/o albergar una o más mutaciones que reducen o eliminan la actividad catalítica y/o la citotoxicidad) pueden estar directamente unidas entre sí y/o adecuadamente unidas entre sí a través de una o más secuencias de polipéptidos intermedias, tal como con uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos aquí.

C. Enlaces que conectan componentes polipeptídicos de la invención y/o sus subcomponentes

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

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

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

aproximadamente 25 residuos de aminoácidos. La longitud del enlazador seleccionado dependerá de una variedad de factores, tales como, por ejemplo, la propiedad o propiedades deseadas para las que se selecciona el enlazador (véase, por ejemplo Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev.* 65: 1357-1369 (2013)).

- 5 Los enlazadores adecuados pueden ser no proteínicos, tales como, por ejemplo, enlazadores químicos (véase, por ejemplo Dosio F et al, *Toxins* 3: 848-83 (2011); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)). Se pueden usar varios enlazadores no proteínicos conocidos en la técnica para enlazar regiones de unión a las regiones efectoras de la toxina Shiga, tales como enlazadores comúnmente usados para conjugar polipéptidos derivados de inmunoglobulina a polipéptidos heterólogos. Por ejemplo, las regiones de polipéptidos de las proteínas de la presente invención
- 10 pueden unirse usando las cadenas laterales funcionales de sus residuos de aminoácidos y restos de carbohidrato, tales como, por ejemplo, un grupo carboxi, amina, sulfhidrilo, ácido carboxílico, carbonilo, hidroxilo y/o anillo cíclico. Por ejemplo, se pueden usar enlaces disulfuro y enlaces tioéter para unir dos o más polipéptidos (véase, por ejemplo Fitzgerald D et al, *Bioconjugate Chem.* 1: 264-8 (1990); Pasqualucci L et al, *Haematologica* 80: 546-56 (1995)). Además, se pueden utilizar residuos de aminoácidos no naturales con otras cadenas laterales funcionales, tales como grupos cetona (véase, por ejemplo Sun S et al, *Chembiochem* 18 jul (2014); Tian F et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 1766-1771 (2014)). Los ejemplos de enlazadores químicos no proteicos incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato, S-(N-succinimidil) tioacetato (SATA), N-succinimidil-oxicarbonil-cu-metil-
- 15 a-(2-piridilditio) tolueno (SMPT), N-succinimidil 4-(2-piridilditio) pentanoato (SPP), succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano carboxilato (SMCC o MCC), sulfosuccinimidil (4-yodoacetil) aminobenzoato, 4-succinimidil-oxicarbonil- α -(2-piridilditio) tolueno, sulfosuccinimidil-6-(α -metil- α -(piridilditio)-toluamido) hexanoato, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionamido (SPDP), succinimidil 6(3-(2-piridilditio)-propionamido) hexanoato, sulfosuccinimidil 6(3-(2-piridilditio)-propionamido) hexanoato, maleimidocaproil (MC), maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobencilocarbonilo (MC-vc-PAB), éster N-hidroxisuccinimida de ácido 3-maleimidobenzoico (MBS), derivados de alfa alquilo, sulfoNHS-ATMBA (sulfosuccinimidil N-[3-(acetiltio)-3-metilbutiril-beta-alanina]), sulfodiclofenol, 2-iminotiolano, 3-(2-piridilditio)
- 20 -propionilhidrazida, reactivo de Ellman, ácido diclorotriazínico y S-(2-tiopiridil)-L-cisteína (véase, por ejemplo Thorpe P et al, *Eur J Biochem.* 147: 197-206 (1985); Thorpe P et al, *Cancer Res.* 47: 5924-31 (1987); Thorpe P et al, *Cancer Res.* 48: 6396-403 (1988); Grossbard M et al, *Blood* 79: 576-85 (1992); Lui C et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8618-23 (1996); Doronina S et al, *Nat Biotechnol* 21: 778-84 (2003); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)).
- 25 Los enlazadores adecuados, sean proteínicos o no proteínicos, pueden incluir, por ejemplo, enlazadores sensibles a la proteasa, sensibles a potencial redox ambiente, sensible al pH, escindibles al ácido, fotoescindible y/o sensibles al calor (véase por ejemplo Dosio F et al, *Toxins* 3: 848-83 (2011); Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-1369 (2013); Feld J et al, *Oncotarget* 4: 397-412 (2013)).
- 30 Los enlazadores proteicos pueden ser elegidos para la incorporación en proteínas de fusión recombinantes de la presente invención. Por ejemplo, los polipéptidos componentes de las proteínas de la presente invención o sus subcomponentes pueden estar unidos por uno o más enlazadores que comprenden uno o más aminoácidos, péptidos y/o polipéptidos. Para las proteínas de fusión recombinantes de la invención, los enlazadores comprenden típicamente de aproximadamente 2 a 50 residuos de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 5 a 30
- 35 residuos de aminoácidos (Argos P, *J Mol Biol* 211: 943-58 (1990); Williamson M, *Biochem J* 297: 240-60 (1994); George R, Heringa J, *Protein Eng* 15: 871-9 (2002); Kreitman R, *AAPS J* 8: E532-51 (2006)). Comúnmente, los enlazadores proteicos comprenden una mayoría de residuos de aminoácidos con residuos polares, no cargados, y/o cargados, tales como, por ejemplo, treoninas, prolina, glutaminas, glicinas y alaninas (véase, por ejemplo Huston J et al, *Proc Natl Acad Sci USA.* 85: 5879-83 (1988); Pastan I et al, *Annu Rev Med.* 58: 221-37 (2007); Li J et al, *Cell Immunol.* 118: 85-99 (1989); Cumber A et al *Bioconj Chem* 3: 397-401 (1992); Friedman P et al, *Cancer Res* 53: 334-9 (1993); Whitlow M et al, *Protein Engineering* 6: 989-95 (1993); Siegall C et al, *J Immunol* 152: 2377-84 (1994); Newton et al *Biochemistry* 35: 545-53 (1996); Ladurner et al *J Mol Biol* 273: 330-7 (1997); Kreitman R et al, *Leuk Lymphoma* 52 : 82-6 (2011), US 4.894.443). Los ejemplos no limitantes de enlazadores proteicos incluyen alanina-serina-glicina-glicina-prolina-glutamato (ASGGPE) (SEQ ID NO: 89), valina-metionina (VM), alanina-metionina (AM), AM (G_{2a4S})_xAM (SEQ ID NO: 90) donde G es glicina, S es serina, y x es un número entero de 1 a 10.
- 40
- 45
- 50

Los enlazadores proteicos pueden ser seleccionados en base a las propiedades deseadas. Los enlazadores proteicos pueden ser elegidos por el experto en la materia con características específicas en mente, tales como para optimizar uno o más de las propiedades de plegamiento de la molécula de fusión, estabilidad, expresión, solubilidad, propiedades farmacocinéticas, propiedades farmacodinámicas, y/o la actividad de los dominios fusionados en el

55 contexto de un constructo de fusión en comparación con la actividad del mismo dominio por sí mismo. Por ejemplo, los enlazadores proteináceos pueden seleccionarse basándose en la flexibilidad, la rigidez, y/o capacidad de escisión (véase, por ejemplo Chen X et al, *Adv Drug Deliv Rev.* 65: 1357-1369 (2013)). El experto en la materia puede utilizar bases de datos y herramientas de software de diseño de enlazadores para elegir enlazadores. Ciertos enlazadores se pueden elegir para optimizar la expresión (véase, por ejemplo Turner D et al, *J Immunol Methods* 205: 43-54 (1997)). Ciertos enlazadores pueden elegirse para promover las interacciones intermoleculares entre polipéptidos o proteínas idénticas para formar homomultímeros o diferentes polipéptidos o proteínas para formar heteromultímeros. Por ejemplo, los enlazadores proteináceos pueden ser seleccionados que permitan interacciones no covalentes deseadas entre los componentes de polipéptidos de proteínas de la invención, tales como, por

60 ejemplo, interacciones relacionadas con la formación de dímeros y otros multímeros de orden superior (ver por

65

ejemplo, US 4.946.778).

Los enlazadores proteicos flexibles son a menudo mayores que 12 residuos de aminoácidos de largo y ricos en residuos de aminoácidos no polares pequeños, residuos de aminoácidos polares, y/o residuos de aminoácidos hidrófilos, tales como, por ejemplo, glicinas, serinas y treoninas (ver por ejemplo Bird R et al, Science 242: 423-6 (1988); Friedman P et al, Cancer Res. 53: 334-9 (1993); Siegall C et al, J Immunol 152: 2377-84 (1994)). Los enlazadores proteicos flexibles pueden ser elegidos para aumentar la separación espacial entre los componentes y/o para permitir interacciones intramoleculares entre los componentes. Por ejemplo, diversos enlazadores "GS" son conocidos por el experto y se componen de múltiples glicinas y/o una o más serinas, a veces en unidades de repetición, tales como, por ejemplo, $(G_xS)_n$ (SEQ ID NO: 82), $(S_xG)_n$ (SEQ ID NO: 83), $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 84), y $(G)_n$ (SEQ ID NO: 85), en la que x es de 1 a 6 y n es de 1 a 30 (véase por ejemplo WO 96/06641). Los ejemplos no limitantes de enlazadores proteicos flexibles incluyen GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 86), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 87), GSTSGSGKSSEGGSGSTKG (SEQ ID NO: 88), GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 90), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 91), SRSSG (SEQ ID NO: 92), y SGSSC (SEQ ID NO: 93).

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

Los enlazadores adecuados pueden ser elegidos para permitir la separación *in vivo* de los componentes, tales como, por ejemplo, debido a la escisión y/o inestabilidad específica del entorno (ver Dosio F et al, Toxins. 3: 848-83 (2011); Chen X et al., Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* son capaces de desunirse mediante procesamiento proteolítico y/o de reducir entornos a menudo en un sitio específico dentro de un organismo o dentro de un cierto tipo de célula (véase, por ejemplo Doronina S et al, Bioconjug Chem. 17: 144-24 (2006); Erickson H et al, Cancer Res 66: 4426-33 (2006)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* a menudo comprenden motivos sensible a la proteasa y/o enlaces disulfuro formados por un o más pares de cisteína (véase, por ejemplo Pietersz G et al, Cancer Res 48: 4469-76 (1998); El J et al, J Immunol. Procedimientos 110: 101-9 (1998); ver Chen X et al, Adv Drug Deliv Rev 65: 1357-1369 (2013)). Los enlazadores escindibles proteicos *in vivo* pueden ser diseñados para ser sensibles a las proteasas que sólo existen en ciertos lugares en un organismo, compartimentos dentro de una célula y/o se vuelven activos sólo en ciertas condiciones fisiológicas o patológicas (tales como, por ejemplo, proteasas con niveles anormalmente altos, proteasas sobreexpresadas en ciertos sitios de la enfermedad, y proteasas expresadas específicamente por un microorganismo patógeno). Por ejemplo, hay enlazadores proteicos conocidos en la técnica que son escindidos por proteasas presentes solamente intracelularmente, las proteasas presentes sólo dentro de determinados tipos de células, y las proteasas presentes sólo en condiciones patológicas, como el cáncer o la inflamación, tales como, por ejemplo, motivo R-x-x-R y AMGRSGGGCAGNRVGSLSGGLNLQAM (SEQ ID NO: 94).

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

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

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

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

Los enlazadores fotoescindibles son enlazadores que se escinden después de la exposición a la radiación

electromagnética de ciertos intervalos de longitud de onda, tales como luz en el rango visible (véase, por ejemplo Goldmacher V et al, *Bioconj Chem.* 3: 104-7 (1992)). Los enlazadores fotoescindibles se pueden usar para liberar un componente de una molécula de la invención, por ejemplo un componente de polipéptido, tras la exposición a la luz de determinadas longitudes de onda. Los ejemplos no limitantes de enlazadores fotoescindibles incluyen un grupo nitrobencilo como grupo protector fotoescindible para cisteína, reticuladores de cloruro de nitrobenzoxicarbonilo, copolímero de hidroxipropilmetacrilamida, copolímero de glicina, copolímero de fluoresceína y copolímero de metilrodamina (Hazum E et al., *Pept Proc Eur Pept Symp.* 16a, Brunfeldt K, ed, 105-110 (1981); Senter et al, *Photochem Photobiol* 42: 231-7 (1985); Yen et al, *Makromol Chem.* 190: 69-82 (1989); Goldmacher V et al, *Bioconj Chem.* 3: 104-7 (1992)). Los enlazadores fotoescindibles pueden tener usos particulares en la unión de componentes para formar moléculas de la invención diseñada para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones que pueden ser expuestas a la luz utilizando fibra óptica.

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

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, la proteína comprende una región de unión que es un scFv con un enlazador que conecta un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena ligera (V_L). Hay numerosos enlazadores conocidos en la técnica adecuados para este propósito, tales como, por ejemplo, el péptido de 15 residuos (Gly4Ser)₃ (SEQ ID NO: 95). Enlazadores de scFv adecuados que pueden ser utilizados en la formación de estructuras multivalentes no covalentes incluyen GGS, GGGG (Gly3Ser o G3S) (SEQ ID NO: 96), GGGGS (Gly4Ser o G4S) (SEQ ID NO: 97), GGGGSGGG (SEQ ID NO : 98), GGSGGGG (SEQ ID NO: 99), GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 100), y GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO: 101) (Plückthun A, Pack P, *Immunotechnology* 3: 83-105 (1997); Atwell J et al, *Protein Eng.* 12: 597-604 (1999); Wu A et al, *Protein Eng* 14: 1025-1033 (2001); Yazaki P et al, *J Immunol Methods* 253: 195-208 (2001); Carmichael J et al, *J Mol Biol* 326: 341-51 (2003); Arndt M et al, *FEBS Lett* 578: 257-61 (2004); Bie C et al, *World J Hepatol* 2: 185-91 (2010)).

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

II Ejemplos de variaciones estructurales específicas de las proteínas de la invención.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, las proteínas de la invención comprenden una región de unión derivada de un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado por la unión específica y de alta afinidad a un antígeno de superficie, tal como se define en las reivindicaciones, en la superficie celular de una célula cancerosa, donde se restringe el antígeno en la expresión a las células cancerosas (véase Glokler J et al, las moléculas 15: 2478-90 (2010); Liu Y et al, *Lab chip de* 9: 1033-6 (2009)). De acuerdo con otras realizaciones, se selecciona la región de unión para una unión específica y de alta afinidad a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde el antígeno es sobreexpresado o preferencialmente expresado 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 de células inmunes específicos.

Existen muchas regiones de unión de tipo inmunoglobulina que reconocen epítopos asociados con células cancerosas en la técnica anterior, tales como las regiones de unión que reconocen (los nombres alternativos se indican entre paréntesis) anexina A1, antígeno de melanoma B3, antígeno de melanoma B4, CD2, CD3, CD4, CD20 (proteína de antígeno de linfocitos B CD20), CD22, CD25 (receptor de interleuquina-2 IL2R), CD30 (TNFRSF8), CD38 (ADP ribosa cíclica hidrolasa), CD40, CD44 (receptor de hialuronano), ITGAV (CD51), CD66, CD71 (receptor de transferrina), CD73, CD74 (cadena invariante asociada a antígenos de HLA-DR), CD79, CD98, endoglina (FIN o CD105), CD106 (VCAM-1), receptor de quimioquinas tipo 4 (CD44, fusina, CD184), CD200, receptor de factor de crecimiento 1 semejante a insulina (CD221), mucina 1 (MUC1, CD227), molécula de adhesión de células basales (B-CAM o CD239), CD248 (endosialina o TEM1), receptor del factor necrosis tumoral 10b (TNFRSF10B, CD262), receptor del factor de necrosis tumoral 13B (TNFRSF13B, TACI, CD276), receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (KDR, CD309), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM, CD326), receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2/Neu/ErbB2/CD340), antígeno de cáncer 15-3 (CA15-3), antígeno de cáncer 19-9 (CA 19-9), antígeno de cáncer 125 (CA125, MUC16), CA242, moléculas de adhesión celular relacionadas con antígeno carcinoembrionario (por ejemplo CEACAM3 (CD66d) y CEACAM5), proteína de antígeno carcinoembrionario (CEA), proteoglicanos de sulfato de condroitina 4 (CSP4, MCSP, NG2), CTLA4, DLL4, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB1), receptor de folato (FOLR), G-28, gangliósido GD2, gangliósido GD3, HLA-DR10, HLA-DRB, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 1 (HER1), receptor 2 de Efrina tipo-B (EphB2), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), proteína de activación de fibroblastos (FAP/seprasa), receptor del factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF1R), receptor de interleuquina 2 (IL-2R),

receptor de interleuquina 6 (IL-6R), integrinas alfa-V beta-3 ($\alpha_v\beta_3$), integrinas alfa-V beta-5, integrinas alfa-5 beta-1 ($\alpha_5\beta_1$), L6, MPG, proteína de antígeno asociado a melanoma 1 (MAGE 1), antígeno asociado a melanoma 3 (MAGE-3), mesotelina (MSLN), MPG, MS4A, p21, p97, receptor de virus de la polio similar 4 (PVRL4), receptores activados por proteasa (tales como PAR1), proteína de antígeno de membrana específica de la próstata (PSMA), glicoproteína de trofoblasto (TPGB) y transductores señal de calcio asociados a tumores (TACSTDs) (véase, por ejemplo Lui B et al, *Cancer Res.* 64: 704-10 (2004); Novellino L et al, *Cancer Immunol Immunother* 54: 187-207 (2005); Bagley R et al, *Int J Oncol* 34: 619-27 (2009); Gerber H et al, *mAbs* 1: 247-53 (2009); Beck A et al, *Nat Rev Immunol.* 10: 345-52 (2010); Andersen J et al, *J Biol Chem* 287: 22927-37 (2012); Nolan-Stevaux O et al, *PLoS One* 7: e50920 (2012); Rust S et al, *Cancer Mol* 12: 11 (2013)). Esta lista de biomoléculas diana no pretende ser limitativa. Se apreciará por el experto en la materia que cualquier biomolécula diana deseada, tal como se define en las reivindicaciones, asociada con una célula de cáncer u otro tipo de célula deseada se puede usar para diseñar o seleccionar una región de unión para acoplarse con la región efectora de la toxina Shiga para producir una proteína de la invención.

Ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con las células cancerosas y regiones de unión de tipo inmunoglobulina conocidas por unirse a las mismas incluyen proteínas BAGE (antígenos de melanoma B), moléculas de adhesión celular basal (BCAMs o glicoproteínas de grupos sanguíneos luteranos), antígeno de tumor de vejiga (BTA), antígeno de cáncer de testículo-NY-ESO-1, proteínas LAGE de antígeno de cáncer de testículo, CD19 (proteína de antígeno de linfocitos B CD19), CD21 (receptor del complemento-2 o receptor del complemento 3d), CD26 (dipeptidil peptidasa-4, DPP4, o proteína complejante de adenosina desaminasa 2), CD33 (lectina de tipo inmunoglobulina 3 de unión a ácido siálico), CD52 (antígeno de CAMPATH-1), CD56 (molécula de adhesión celular neural o NCAM), CD133 (prominina-1), CS1 (familia SLAM número 7 o SLAMF7), proteína de antígeno de la superficie celular A33 (gpA33), proteínas de antígeno de virus Epstein-Barr, proteínas GAGE/PAGE (antígenos de cáncer/testículo asociado a melanoma), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR o c-Met), proteínas MAGE, antígeno de melanoma reconocido por proteína 1 de células T (MART-1/MelanA, MARTI), mucinas, expresados proteínas de antígeno preferencialmente expresadas de melanoma (PRAME), proteína de antígeno específica de próstata (PSA), proteína de antígeno de células madre de próstata (PSCA), receptor para productos finales de glucosilación avanzada (RAGE), glicoproteína asociada a tumor 72 (TAG -72), receptor transmembrana de proteína tirosina quinasa (ROR1 o NTRKR1), receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFRs) y el antígeno de tumor de Wilms.

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

Además, existen numerosos otros ejemplos de biomoléculas diana contempladas, tales como las metaloproteinasas de ADAM (por ejemplo, ADAM-9, ADAM-10, ADAM-12, ADAM-15, ADAM-17), ADP-ribosiltransferasas (ART1, ART4), antígeno F4/80, antígenos de estroma de médula ósea (BST1, BST2), proteínas del oncogén c-abl de la región clúster de punto de ruptura (BCR-aBL), C3aR (receptores del componente de complemento 3a), CD7, CD13, CD14, CD15 (antígeno embrionario Lewis X o específico de etapa 1), CD23 (FC epsilon RII), CD49d, CD53, CD54 (molécula de adhesión intercelular 1), CD63 (tetraspanina), CD69, CD80, CD86, CD88 (receptor 1 de componente de complemento componente 5a), CD115 (receptor del factor estimulante de colonias 1), CD123 (receptor de interleuquina-3), CD129 (receptor de interleuquina 9), CD183 (receptor de quimioquinas CXCR3), CD191 (CCR1), CD193 (CCR3), CD195 (receptor de quimioquina CCR5), CD203c, CD225 (proteína transmembrana inducida por interferón 1), CD244 (receptor de células asesinas naturales 2B4), CD282 (receptor de tipo Toll 2), CD284 (receptor de tipo Toll 4), CD294 (GPR44), CD305 (receptor de tipo inmunoglobulina asociado a leucocitos 1), receptor 2 de efrina tipo-A (EphA2), Fc ϵ R1a, galectina-9, proteína de antígeno alfa-fetoproteína 17-A1, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana (HAAH), transcripción similar a inmunoglobulina ILT-3, lisofosfatidilglicerol aciltransferasa 1 (LPGAT1/IAA0205), proteínas de membrana asociada a lisosoma (LAMP, tales como CD107), proteínas de melanocitos PMEL (gp100), proteína-14 relacionada con meloide (MRP-14), ligando 1 de muerte programada (PD-L1), receptor de proteína tirosina quinasa erbB-3, proteínas SART, receptores scavenger (tales como CD64 y CD68), Siglecs (lectinas de tipo inmunoglobulina de unión a ácido siálico), sindecanos (tales como SDC1 o CD138), tirosinasa, proteína relacionada con la tirosinasa 1 (TRP-1), proteína relacionada con tirosinasa 2 (TRP-2), antígeno asociado a tirosinasa (TAA), APO-3, BCMA, CD2, CD3, CD4, CD8, CD18, CD27, CD28, CD29, CD41, CD49, CD90, CD95 (Fas), CD103, CD104, CD134 (OX40), CD137 (41BB), CD152 (CTLA-4), receptores de quimioquinas, proteínas del complemento, receptores de citocinas, proteínas de histocompatibilidad, ICOS, interferón-alfa, interferón-beta, c-myc, osteoprotegerina, PD-1, RANK, TACI, miembro de la superfamilia de receptores de TNF (TNF-R1, TNFR-2), Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3, y TRAIL-R4 (ver, Cheever M et al, *Clin Cancer Res.* 15:

5323-37 (2009); Scott A et al, Cancer Immun 12: 14 (2012)), para biomoléculas diana y cabe indicar que las moléculas diana descritas en la misma son ejemplos no limitantes). Se apreciará por el experto en la materia que cualquier biomolécula diana deseada, tal como se define en las reivindicaciones, se puede usar para diseñar o seleccionar una región de unión para ser acoplada con la región efectora de toxina Shiga para producir una proteína de la invención.

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

En ciertas realizaciones, la región de unión se une con alta afinidad a la biomolécula diana que es un receptor de quimioquinas seleccionado de los siguientes CXCR-1, CXCR-2, CXCR-3 A, CXCR3B, CXCR-4, CXCR-5, CCR-1, CCR-2A, CCR-2B, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, CCR-7, CCR-8, CCR-9, CCR-10, CX3CR-1, XCR1, CXCR-6, CXCR-7, la proteína-2 de unión a quimioquinas (CCBP2, receptor D6), y el receptor de antígeno/quimioquinas Duffy (DARC glicoproteína, Fy, FY, CD234). Para más biomoléculas diana no limitantes, véase la Tabla 11 en los Ejemplos siguientes.

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

En ciertas realizaciones de la descripción, las proteínas comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-508 de la SEQ ID NO: 4, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a CD38 humano. Otras realizaciones de la descripción son las proteínas comprenden o que consisten esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en SEQ ID NOs: 4-7.

En ciertas realizaciones de la invención, tal como se define en las reivindicaciones, las proteínas de la presente invención comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-512 de la SEQ ID No: 8, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a HER2 humano. Otras realizaciones son las proteínas que comprenden o consisten esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID No: 8-11.

En ciertas realizaciones de la descripción, las proteínas comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-516 de SEQ ID No: 12, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a CD19 humano. Otras realizaciones de la descripción son las proteínas que comprenden o consisten esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID No: 12-15.

En ciertas realizaciones de la descripción, las proteínas comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-518 de la SEQ ID NO: 16, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a CD74 humano. Otras realizaciones de la descripción son las proteínas que comprenden o consisten esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID No: 16-19.

Entre ciertas realizaciones de las proteínas de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, la región de unión es una región derivada de inmunoglobulina de dominio único V_HH que muestra una unión de alta afinidad específicamente a HER2, tal como 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 ciertas realizaciones adicionales, las proteínas comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 268-385 de la SEQ ID No: 20, que muestra una unión de alta afinidad específicamente a HER2 humano. Otras realizaciones de la descripción son las proteínas que comprenden o consisten esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID No: 20-29.

En ciertas realizaciones de la descripción, las proteínas comprenden la región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 269-365 de SEQ ID NO: 16, que muestra una unión de alta

afinidad específicamente a CD20 humano. Otras realizaciones de la descripción son las proteínas que comprenden o que consisten esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID No: 30-31.

Tal como se utiliza aquí, 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 a un epítipo de un antígeno específico. Desde el extremo amino-terminal al extremo carboxilo terminal, ambos dominios V_H y V_L comprenden las siguientes regiones marco (FR) y regiones CDR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Para fragmentos V_{HH} de camélido, IgNARs de peces cartilagosos, fragmentos V_{NAR} y derivados de los mismos, existe un solo dominio variable de cadena pesada que comprende la misma disposición básica: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

Está dentro del alcance de la presente invención usar fragmentos, variantes y/o derivados de los polipéptidos de las proteínas de la invención que contienen un sitio de unión a biomolécula diana extracelular funcional, tal como se define en las reivindicaciones, e incluso más preferiblemente capaces de unirse a la biomolécula diana con alta afinidad (por ejemplo, tal como se muestra por K_D). Por ejemplo, mientras que la invención proporciona secuencias de polipéptidos que pueden unirse a HER2, cualquier región de unión de tipo inmunoglobulina que comprende un polipéptido, tal como se define en las reivindicaciones, que se une a HER2 extracelular, expresado en una superficie celular, con una constante de disociación de 10^{-5} a 10^{-12} moles por litro, preferiblemente menos de 200 nM, puede ser sustituida para uso en la fabricación de proteínas de la invención y los procedimientos de la invención.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de una región derivada de inmunoglobulina de dominio único V_{HH} , tal como se define en las reivindicaciones. En general, los nanocuerpos® se construyen a partir de fragmentos de anticuerpos monoméricos de dominio variable únicos naturales (sdAbs) del tipo encontrado en camélidos y peces cartilagosos (Chondrichthyes). Los nanobodies® están diseñados a partir de estos anticuerpos naturales truncando el dominio variable monomérico único para crear una molécula más pequeña y más estable. Debido a su pequeño tamaño, los nanocuerpos® pueden unirse a antígenos que no son accesibles a anticuerpos completos. Entre ciertas realizaciones de la presente invención, la región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de una región derivada de inmunoglobulina de dominio único V_{HH} que exhibe una unión de alta afinidad específicamente a las proteínas HER2 humanas.

III. Funciones generales de las proteínas de la invención.

La presente invención proporciona varias proteínas citotóxicas, que comprenden 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 oxina Shiga citotóxica, 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 la toxina Shiga permite la ingeniería del reconocimiento específico del tipo celular de la potente citotoxicidad de la toxina Shiga. Las proteínas de la invención son capaces de unir biomoléculas diana extracelulares asociadas con la superficie celular de tipos celulares particulares y entrar en esas células, tal como se define en las reivindicaciones. Una vez internalizadas dentro de un tipo de célula diana, ciertas realizaciones de las proteínas de la invención son capaces de dirigir un fragmento de polipéptido efector de la toxina Shiga citotóxica hacia el 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, interferir con la homeostasis celular y finalmente matar la célula. Este sistema es modular, ya que se puede usar cualquier cantidad de regiones de unión de tipo inmunoglobulina diversas para dirigir esta potente citotoxicidad o citostasis a diversos tipos de células diversas. Alternativamente, las variantes no tóxicas de las proteínas de la descripción pueden usarse para suministrar materiales exógenos adicionales a las células diana, tales como agentes promotores de detección para etiquetar los interiores de las células diana para funciones de recopilación de información de diagnóstico.

A. Eliminación de células a través de la citotoxicidad dirigida de la toxina Shiga

Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para eliminar células eucariotas, las proteínas diseñadas usando regiones efectoras de toxinas Shiga pueden mostrar una potente actividad de eliminación celular. 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 invención aprovechan este mecanismo citotóxico pero deben ser capaces de llevar la región efectora de la toxina Shiga al citosol de un tipo de célula diana. La orientación de la ingeniería afecta la citotoxicidad probablemente al mejorar el suministro al citosol a través de funcionalidades nativas a las regiones efectoras de la toxina Shiga.

En ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la presente invención, al contactar una célula físicamente acoplada con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina de una proteína citotóxica de la invención, la proteína citotóxica es capaz de causar la muerte de la célula. La eliminación celular puede lograrse usando una proteína citotóxica de la 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*.

La expresión de la biomolécula diana no tiene que ser nativa con el fin de eliminar células diana por una proteína citotóxica de la invención. La expresión en la superficie celular de la biomolécula diana podría ser el resultado de una infección, la presencia de un patógeno, y/o la presencia de un patógeno microbiano intracelular. La expresión de una biomolécula diana podría ser artificial tal como, por ejemplo, por expresión forzada o inducida después de la infección con un vector de expresión viral, véase, por ejemplo, sistemas adenovirales, adeno-asociados y los sistemas retrovirales. Un ejemplo de la inducción de la expresión de una biomolécula diana es la regulación positiva de la expresión de CD38 de las células expuestas a los retinoides, como el ácido todo-trans retinoico y diversos retinoides sintéticos, o cualquier agonista del receptor de ácido retinoico (RAR) (Drach J et al., Cancer Res 54: 1746-1752 (1994); Urano A et al, J Leukoc Biol. 90: 235-47 (2011)). En otro ejemplo, la expresión de CD20, HER2 y EGFR pueden ser inducida mediante la exposición de una célula a la radiación ionizante (Wattenberg M et al, Br J Cancer. 110: 1472-1480 (2014)).

B. Citotoxicidad selectiva entre tipos de células.

Al dirigirse el suministro a regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas utilizando 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 destruir preferentemente los tipos de células seleccionados. La presente invención proporciona diversas proteínas citotóxicas con esta capacidad funcional, tal como se define en las reivindicaciones.

En ciertas realizaciones, la administración de la proteína citotóxica de la presente invención a una mezcla de tipos de células, la proteína citotóxica es capaz de matar selectivamente aquellas células que están físicamente acopladas con una determinada biomolécula diana extracelular en comparación con los tipos de células que no están acopladas físicamente con cualquier biomolécula diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína citotóxica. Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para matar células eucariotas, las proteínas citotóxicas diseñadas usando regiones efectoras de toxinas Shiga pueden mostrar una potente actividad citotóxica. Al dirigirse el suministro de regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas a tipos de células específicas usando regiones de unión de alta afinidad, esta potente actividad de eliminación celular puede restringirse a matar preferentemente solo aquellos tipos de células que desean ser reconocidos por su asociación física con una biomolécula unida específicamente unida por regiones de unión elegidas.

En ciertas realizaciones, la proteína citotóxica de la presente invención es capaz de causar selectiva o preferentemente la muerte de un tipo celular específico dentro de una mezcla de dos o más tipos celulares diferentes. Esto permite dirigir la actividad citotóxica a tipos de células específicos con una alta preferencia, tal como un efecto citotóxico de 3 veces, sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan la biomolécula diana. Alternativamente, la expresión de la biomolécula diana de la región de unión puede no ser exclusiva de un tipo de célula si la biomolécula diana se expresa en cantidades suficientemente bajas y/o está físicamente acoplada en cantidades bajas con tipos de células que no son diana. Esto permite la eliminación selectiva de células 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.

Los niveles de biomoléculas diana extracelulares en la superficie de las células pueden determinarse usando varios procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, procedimientos FACS. Tal como se usa en el presente documento, una cantidad significativa de una biomolécula diana extracelular expresada en una superficie celular es mayor que 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000 o 70.000 de intensidad de fluorescencia media (MFI) mediante análisis FACS dependiendo del tipo de célula.

En ciertas realizaciones adicionales, la administración de la proteína citotóxica de la invención a dos poblaciones de tipos celulares que difieren con respecto a la presencia y/o secuencia de polipéptidos de una biomolécula diana extracelular, 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 al menos tres veces menor que la dosis de 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 de una proteína de la presente invención hacia poblaciones de tipos celulares físicamente acoplados con una biomolécula diana extracelular es al menos 3 veces mayor que la actividad

citotóxica hacia poblaciones de tipos celulares no físicamente acoplados a ninguna biomolécula diana extracelular unida específicamente por la proteína de la invención. De acuerdo con la presente invención, la citotoxicidad selectiva puede cuantificarse en términos de la relación (a/b) de (a) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo de célula específico físicamente acoplado con una biomolécula diana de la región de unión con respecto a (b) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo celular no físicamente acoplado con una biomolécula diana de la región de unión. En ciertas realizaciones de la descripción, la relación de citotoxicidad es indicativa de 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 para poblaciones de células o tipos de células físicamente acopladas con una biomolécula diana de la región de unión en comparación con poblaciones de células o tipos de células que no están físicamente acopladas con una biomolécula diana de la región de unión.

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).

En ciertas realizaciones, las proteínas de la presente invención son capaces de causar selectivamente o preferencialmente la muerte de un tipo celular específico dentro de una mezcla de dos o más tipos de células diferentes. Esto permite la actividad citotóxica dirigida a determinados tipos de células con una alta preferencialidad, tal como un efecto citotóxico de 3 veces sobre tipos de células "espectadoras" que no expresan la diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína citotóxica de la invención. Alternativamente, la expresión de una biomolécula diana extracelular puede ser no exclusiva para un tipo de célula si la biomolécula diana extracelular se expresa en suficientes cantidades bajas por tipos de células que no son reconocidas. Esto permite la eliminación celular preferencial de sólo aquel o aquellos tipos celulares que expresan las cantidades más altas de biomoléculas diana extracelulares, tales como un efecto citotóxico de 3 veces sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula diana unida específicamente por la proteína citotóxica y/o no están acopladas físicamente a cantidades significativas de biomolécula diana expuesta extracelularmente específicamente unida por la proteína citotóxica.

Las proteínas citotóxicas de la presente invención son útiles para la eliminación de poblaciones de tipos de células específicos. Por ejemplo, las proteínas citotóxicas de la invención son útiles para el tratamiento de ciertos tumores, cánceres, y/u otras anormalidades de crecimiento mediante la eliminación de células de "biomolécula diana+" que expresan niveles elevados de biomolécula diana en una o más superficies celulares.

En ciertas realizaciones, la actividad citotóxica de una proteína de la presente invención hacia poblaciones de tipos celulares físicamente acoplados con una determinada biomolécula diana extracelular es al menos 3 veces mayor que la actividad citotóxica hacia poblaciones de tipos celulares no físicamente acoplados con cantidades significativas de una biomolécula diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína particular de la invención. De acuerdo con la presente invención, la citotoxicidad selectiva puede cuantificarse en términos de la relación (a/b) de (a) citotoxicidad hacia una población de células físicamente acopladas con una cantidad significativa de una biomolécula diana extracelular unida por la región de unión de la proteína citotóxica de la invención con respecto a (b) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo celular que no está físicamente acoplado con una cantidad significativa de ninguna biomolécula diana extracelular unida específicamente por la región de unión de esa proteína citotóxica particular de la invención. En ciertas realizaciones, la relación de citotoxicidad es indicativa de 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 para poblaciones de células o tipos de células que expresan una biomolécula diana extracelular o físicamente acoplada con una biomolécula diana extracelular unida por el región de unión de la proteína citotóxica de la invención en comparación con poblaciones de células o tipos de células que no expresan una biomolécula diana extracelular o que no están físicamente acopladas con cantidades significativas de una biomolécula diana extracelular unida específicamente a la región de unión de esa proteína citotóxica particular de la invención. Por ejemplo, tras la administración de ciertas proteínas citotóxicas de la presente invención a dos poblaciones diferentes de células que difieren con respecto a la presencia y/o secuencia de polipéptidos de una biomolécula diana extracelular, la proteína citotóxica de la invención es capaz de causar la muerte celular de los tipos de células acoplados físicamente con una biomolécula diana extracelular unida por la región de unión de la proteína citotóxica, por ejemplo, en una CD_{50} que es al menos tres veces menor que la CD_{50} observada para la unión a tipos de células que no están físicamente acopladas con una biomolécula diana extracelular unida por la región de unión de la proteína citotóxica o a tipos de células que están físicamente acoplados solo con formas de esa biomolécula diana extracelular que comprenden variaciones o mutaciones de secuencia que alteran la especificidad de unión por la región de unión de esa proteína citotóxica.

En ciertas realizaciones de las proteínas citotóxicas de la presente invención, 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 (CD₅₀) en una primera población celular, cuyos miembros expresan una determinada biomolécula diana en una superficie celular, a una dosis al menos tres veces menor que la dosis CD₅₀ de la misma proteína citotóxica a una segunda población de células cuyos miembros no expresan esa biomolécula diana, no expresan una cantidad significativa de esa biomolécula diana, o no están exponiendo una cantidad significativa de esa biomolécula diana unida por la región de unión de la proteína citotóxica.

C. Suministro de material exógeno adicional al interior de una célula diana

Además de la eliminación celular directa, las proteínas de la presente invención pueden usarse opcionalmente para el suministro de materiales exógenos adicionales al interior de las células diana. El suministro de materiales exógenos adicionales puede usarse, por ejemplo, para funciones citotóxicas, citostáticas, de recopilación de información y/o diagnósticas. Pueden usarse variantes no tóxicas de las proteínas citotóxicas de la descripción, u opcionalmente variantes tóxicas, para suministrar materiales exógenos adicionales y/o marcar el interior de las células físicamente acopladas con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la proteína de la invención. Las proteínas de la invención pueden dirigir varios tipos de células y/o poblaciones de células que expresan biomoléculas diana a al menos una superficie celular para recibir materiales exógenos. Los componentes funcionales de la presente invención son modulares, en el sentido de que varias regiones efectoras de toxina Shiga y materiales exógenos adicionales pueden unirse a diversas regiones de unión para proporcionar diversas aplicaciones, tales como obtención de imágenes *in vivo* no invasivas de células tumorales.

Debido a que las proteínas de la presente invención, y las formas catalíticamente inactivas de las mismas, son capaces de entrar en las células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular reconocida por su región de unión, ciertas realizaciones de las proteínas de la descripción pueden usarse para administrar exógenos adicionales materiales al interior de tipos de células diana. En un sentido, la proteína completa es un material exógeno que entrará la célula; por lo tanto, los materiales exógenos "adicionales" son materiales heterólogos unidos a, pero que no son la proteína central propia.

"Material exógeno adicional" como se usa en el presente documento se refiere a una o más moléculas, a menudo generalmente no presentes dentro de una célula diana nativa, donde las proteínas de la presente invención pueden usarse para transportar específicamente dicho material al interior de una célula. Ejemplos no limitantes de materiales exógenos adicionales son agentes citotóxicos, péptidos, polipéptidos, proteínas, polinucleótidos, agentes promotores de detección y agentes quimioterapéuticos de molécula pequeña.

En ciertas realizaciones de las proteínas de la presente descripción para el suministro de material exógeno adicional, el material exógeno adicional es un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de molécula pequeña, antibiótico citotóxico, agente alquilante, antimetabolito, inhibidor de topoisomerasa y/o inhibidor de tubulina. Ejemplos de agentes citotóxicos no limitantes incluyen aziridinas, cisplatino, tetrazinas, procarbazona, hexametilmelamina, vinca alcaloides, taxanos, camptotecinas, etopósido, doxorubicina, mitoxantrona, tenipósido, novobiocina, aclarrubicina, antraciclinas, actinomicina, bleomicina, plicamicina, mitomicina, daunorubicina, epirubicina, idarubicina, dolastatina, maitansinas, docetaxel, adriamicina, caliqueamicina, auristatinas, pirrolobenzodiazepina, carboplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, mitomicina C, paclitaxel, 1,3-Bis (2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), rifampicina, cisplatino, metotrexato y gemcitabina.

En ciertas realizaciones de la descripción, el material exógeno adicional comprende una proteína o polipéptido que comprende una enzima. En ciertas otras realizaciones, el material exógeno adicional es un ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un ácido ribonucleico que funciona como un pequeño ARN inhibidor (ARNsi) o microARN (ARNmi). En ciertas realizaciones, el material exógeno adicional es un antígeno, tal como antígenos derivados de proteínas bacterianas, proteínas virales, proteínas mutadas en cáncer, proteínas expresadas aberrantemente en cáncer o regiones determinantes complementarias de células T. Por ejemplo, los materiales exógenos incluyen antígenos, tales como los característicos de las células presentadoras de antígeno infectadas por bacterias, y las regiones determinantes complementarias de células T capaces de funcionar como antígenos exógenos.

D. Recopilación de información para funciones de diagnóstico

Ciertas proteínas de la invención tienen usos en la detección *in vitro* y/o *in vivo* de células específicas, tipos de células y/o poblaciones celulares. En ciertas realizaciones de la descripción, las proteínas citotóxicas descritas en el presente documento se usan tanto para diagnóstico como para tratamiento, o solo para diagnóstico. Cuando se usa la misma proteína citotóxica tanto para el diagnóstico como para el tratamiento, la variante de proteína citotóxica que incorpora un agente promotor de detección para el diagnóstico puede volverse no tóxica mediante la inactivación catalítica de una región efectora de la toxina Shiga a través de una o más sustituciones de aminoácidos, incluyendo sustituciones de ejemplo descritas en este documento. Las formas catalíticamente inactivas de las proteínas citotóxicas de la descripción que se conjugan con agentes promotores de detección pueden usarse opcionalmente para funciones de diagnóstico, tales como diagnósticos complementarios utilizados junto con un régimen terapéutico que comprende la misma región de unión o una relacionada.

La capacidad de los agentes de promoción de detección de conjugados conocidos en la técnica para diversas proteínas de la invención proporciona composiciones útiles para la detección de cáncer, tumor, células inmunes y células infectadas. Estas realizaciones de diagnóstico de las proteínas de la invención pueden usarse para recopilar información a través de diversas técnicas de imagen y ensayos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las realizaciones de diagnóstico de las proteínas de la invención se pueden usar para recopilar información a través de orgánulos intracelulares (por ejemplo, endocitóticos, Golgi, retículo endoplásmico y compartimentos citosólicos) de células cancerosas individuales, células inmunes o células infectadas en un paciente o muestra de biopsia.

Pueden recogerse varios tipos de información utilizando las realizaciones de diagnóstico de las proteínas de la invención ya sea para usos de diagnóstico u otros usos. Esta información puede ser útil, por ejemplo, para diagnosticar tipos de células neoplásicas, determinar la susceptibilidad terapéutica de la enfermedad de un paciente, evaluar la progresión de las terapias antineoplásicas a lo largo del tiempo, ensayar la progresión de las terapias inmunomoduladoras a lo largo del tiempo, evaluar la presencia de células infectadas en materiales de trasplante, evaluar la presencia de tipos de células no deseadas en materiales de trasplante y/o evaluar la presencia de células tumorales residuales después de la escisión quirúrgica de una masa tumoral.

Por ejemplo, las subpoblaciones de pacientes podrían determinarse utilizando la información recopilada utilizando las variantes de diagnóstico de las proteínas de la invención, y a continuación los pacientes individuales podrían clasificarse en subpoblaciones en función de sus características únicas reveladas utilizando esas realizaciones de diagnóstico. Por ejemplo, la efectividad de productos farmacéuticos o terapias específicas podría ser un tipo de criterio utilizado para definir una subpoblación de pacientes. Por ejemplo, una variante de diagnóstico no tóxica de una proteína citotóxica particular de la descripción puede usarse para diferenciar qué pacientes están en una clase o subpoblación de pacientes que se predice que responden positivamente a una variante citotóxica de la misma proteína de la invención. Por consiguiente, los procedimientos asociados para la identificación del paciente, la estratificación y el diagnóstico del paciente usando proteínas de la invención y/o sus variantes no tóxicas se consideran dentro del alcance de la presente descripción.

IV. Variaciones en las secuencias de polipéptidos de las proteínas de la invención que mantienen la estructura general y función

El experto en la materia reconocerá que se pueden hacer variaciones a las proteínas de la presente invención (y a los polinucleótidos que las codifican) dentro del alcance de las reivindicaciones, sin disminuir sus actividades biológicas, por ejemplo manteniendo la estructura general y la función de la proteína de la invención. Por ejemplo, algunas modificaciones pueden facilitar la expresión, purificación, propiedades farmacocinéticas y/o inmunogenicidad. Dichas modificaciones son bien conocidas por el experto e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de inicio, aminoácidos adicionales colocados en cualquiera de los extremos para crear sitios de restricción o codones de terminación convenientemente ubicados, y etiquetas de afinidad bioquímica fusionadas a cualquiera de los extremos terminales para proporcionar una detección y/o purificación conveniente.

También se contempla en el presente documento la inclusión de residuos de aminoácidos adicionales en los extremos amino y/o carboxi, tales como secuencias para etiquetas de epítipo u otros restos. Los residuos de aminoácidos adicionales se pueden usar para diversos fines que incluyen, por ejemplo, para facilitar la clonación, expresión, modificación postraduccional, síntesis, purificación, detección y/o administración. Ejemplos no limitantes de etiquetas de epítipos y restos son: dominios de proteínas de unión a quitina, sitios de escisión por enteropeptidasa, sitios de escisión de Factor Xa, etiquetas FIAsh, etiquetas FLAG, proteínas fluorescentes verdes (GFP), restos de glutatión-S-transferasa, etiquetas HA, dominios de proteínas de unión a maltosa, etiquetas myc, etiquetas de polihistidina, etiquetas ReAsH, etiquetas strep, etiqueta strep II, sitios de proteasa TEV, dominios de tiorredoxina, sitio de escisión de trombina y etiquetas de epítipo V5.

En algunas de las realizaciones anteriores, la proteína de la presente invención es una variante en la que hay una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos introducidas en la región o regiones de polipéptido, tal como se define en las reivindicaciones. Como se usa en el presente documento, el término "sustitución conservadora" indica que uno o más aminoácidos se reemplazan 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 por 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)).

5 En el esquema de sustitución conservadora de la Tabla B a continuación, las sustituciones conservadoras de ejemplo de aminoácidos se agrupan por propiedades fisicoquímicas: I: neutro, hidrófilo; II: ácidos y amidas; III: básico; IV: hidrofóbico; V: aminoácidos aromáticos y voluminosos, VI sin carga hidrofílica, VII sin carga alifática, VIII sin carga polar, IX asociado a cicloalqueno, X hidrofóbico, XI polar, XII pequeño, XIII que permite el giro y XIV flexible. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen lo siguiente: 1) S puede estar sustituido por C; 2) M o L pueden estar sustituidos por F; 3) Y puede estar sustituido por M; 4) Q o E pueden estar sustituidos por K; 5) N o Q pueden estar sustituidos por H; y 6) H puede estar sustituido por N.

10 TABLA B. Ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos

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

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

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

40 En ciertas realizaciones, la región efectora de la toxina Shiga puede alterarse para cambiar su actividad enzimática y/o citotoxicidad siempre que la región efectora de la toxina Shiga conserve una o más funciones efectoras de la toxina Shiga. Este cambio puede o no resultar en un cambio en la citotoxicidad de una proteína de la cual la región efectora de la toxina Shiga alterada es un componente. Las posibles alteraciones incluyen mutaciones en la región efectora de la toxina Shiga seleccionadas del grupo que consiste en: truncamiento, delección, inversión, inserción, reordenamiento y sustitución.

45 La citotoxicidad de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede alterarse, reducirse o eliminarse por mutación o truncamiento. Se ha demostrado que las posiciones etiquetadas como tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, tirosina-114 y triptófano-203 son 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 tanto del glutamato-167 como de la arginina-170 eliminó la actividad enzimática de Stx-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 Slit-I A1 en el retículo endoplásmico, la mutación de glutamato-167 y arginina-170 eliminó la citotoxicidad del fragmento Slit-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 Slit-I A1 que contiene los residuos 1-239 mostró actividad enzimática significativa *in vitro* y citotoxicidad por expresión de novo en el citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). La expresión de un fragmento Slit-I A1 truncado en los residuos 1-239 en el retículo endoplásmico no fue citotóxica porque no pudo retrotranslocarse al citosol (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades A de toxina Shiga se han mapeado en las siguientes posiciones de residuos: asparagina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170, y la arginina-176, entre otras (Di, Toxicon 57: 525-39 (2011)). En 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.

Los residuos más críticos para la unión a ribosomas eucariotas y/o inhibición a ribosomas eucariotas en la subunidad A de la toxina Shiga se han mapeado a las siguientes posiciones de residuos arginina-172, arginina-176, arginina-179, arginina-188, tirosina 189, valina-191 y leucina-233, entre otras (McCluskey A et al., PLoS One 7: e31191 (2012)).

Los truncamientos de la subunidad A de 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 Slit1A (LaPointe, J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). Aunque el fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que se describió que retenía 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)).

En ciertas realizaciones derivadas 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. Los expertos en la materia conocerán ejemplos de tales sustituciones basadas en la técnica anterior, tales como asparagina en la posición 75 a alanina, tirosina en la posición 77 a serina, sustitución de la tirosina en la posición 114 a serina, sustitución del glutamato en la posición 167 a aspartato, sustitución de la arginina en la posición 170 a alanina, sustitución de la arginina en la posición 176 a lisina, y/o sustitución del triptófano en la posición 203 a alanina.

Las proteínas de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con uno o más agentes adicionales, tales como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico conocidos en la técnica, incluyendo agentes, tales como se describen en el presente documento.

V. Producción, fabricación y purificación de una proteína de la invención.

Las proteínas 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 sintéticos estándar, mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. Las proteínas de la invención pueden producirse como proteínas de fusión, conjugados químicamente acoplados y/o combinaciones de los mismos, tales como, por ejemplo, un componente de proteína de fusión acoplado covalentemente a uno o más componentes. Por lo tanto, las proteínas de la invención pueden sintetizarse de varias maneras, que incluyen, por ejemplo, procedimientos que comprenden: (1) sintetizar un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de la invención usando metodología estándar de fase sólida o fase líquida, ya sea paso a paso o por ensamble de fragmentos, y aislar y purificar el producto compuesto peptídico final; (2) expresar un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de la invención en una célula huésped y recuperar el producto de expresión de la célula huésped o cultivo de células huésped; o (3) expresión *in vitro* sin células de un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de la invención, y recuperar el producto de expresión; o mediante cualquier combinación de los procedimientos de (1), (2) o (3) para obtener fragmentos del componente peptídico, uniendo posteriormente (por ejemplo, ligando) los fragmentos para obtener el componente peptídico y recuperando el componente peptídico.

Puede ser preferible sintetizar un polipéptido o componente de polipéptido de una proteína de la presente invención por medio de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase líquida. Las proteínas de la invención pueden fabricarse adecuadamente por procedimientos sintéticos estándar. Por lo tanto, los péptidos pueden sintetizarse mediante, por ejemplo, procedimientos que comprenden sintetizar el péptido mediante metodología estándar en fase sólida o en fase líquida, ya sea por etapas o por ensamblaje de fragmentos, y aislar y purificar el producto peptídico final. En este contexto, se puede hacer referencia al documento WO 1998/11125 o, entre otros, Fields G et al., Principles and Practice of Solid-Phase Peptide Synthesis (Synthetic Peptides, Grant G, ed., Oxford University Press, Reino Unido, 2da. ed., 2002) y los ejemplos de síntesis en los mismos.

Las proteínas de la presente invención pueden prepararse (producirse y purificarse) usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. En general, los procedimientos para preparar polipéptidos mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que comprende el polinucleótido codificador y la recuperación del polipéptido del cultivo celular se describen, por ejemplo, en Sambrook J et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, EE. UU., 1989); Dieffenbach C et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE. UU., 1995). Se puede usar cualquier célula huésped adecuada para producir una proteína de la invención. Las células huésped pueden ser células transfectadas, transformadas, transducidas o infectadas de manera estable o transitoria con uno o más vectores de expresión que conducen la expresión de un polipéptido de la invención. Además, se puede producir una proteína de la invención modificando el polinucleótido que codifica la proteína de la invención que da como resultado la alteración de uno o más aminoácidos o la eliminación o inserción de uno o más aminoácidos para lograr las propiedades deseadas, tales como la citotoxicidad cambiada, efectos citostáticos modificados, inmunogenicidad modificada y/o semivida sérica modificada.

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

Por consiguiente, la presente descripción también proporciona procedimientos para producir una proteína de la presente invención de acuerdo con los procedimientos mencionados anteriormente y usar (i) un polinucleótido que codifica una parte o toda una proteína de la invención o un componente de polipéptido de la misma, (ii) un vector de expresión que comprende al menos un polinucleótido de la invención capaz de codificar parte o la totalidad de una proteína de la invención o un componente de polipéptido de la misma cuando se introduce en una célula huésped adecuada o un sistema de expresión libre de células, y/o (iii) una célula huésped que comprende un polinucleótido o vector de expresión de la invención.

Cuando un polipéptido o proteína se expresa usando 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 los factores de la célula huésped, a efectos de obtener preparaciones que sean de alta pureza o que sean sustancialmente homogéneas. La purificación se puede lograr mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como técnicas de centrifugación, técnicas de extracción, técnicas cromatográficas y de fraccionamiento (por ejemplo, separación por tamaño mediante filtración en gel, separación de carga mediante columna de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía en sílice o resinas de intercambio catiónico tales como DEAE y similares, cromatofocalización y cromatografía de proteína A Sepharosa para eliminar contaminantes) y técnicas de precipitación (por ejemplo, precipitación en etanol o precipitación con sulfato de amonio). Se puede usar cualquier cantidad de técnicas de purificación bioquímica para aumentar la pureza de una proteína de la invención. En ciertas realizaciones, las proteínas de la invención pueden purificarse opcionalmente en formas homo-multiméricas (es decir, un complejo de proteínas de dos o más proteínas idénticas) o en formas hetero-multiméricas (es decir, un complejo de proteínas de dos o más proteínas no idénticas).

En los siguientes ejemplos hay descripciones de ejemplos no limitantes de procedimientos para producir una proteína de la presente invención, así como aspectos específicos, pero no limitantes, de la producción de proteínas para las proteínas citotóxicas, de ejemplo, descritas.

VI. Composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden una proteína de la invención

La presente invención proporciona proteínas 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, tal como se definen en las reivindicaciones y se describen en más detalle a continuación (por ejemplo, cánceres, tumores malignos y tumores no malignos). La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína de la invención, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable de la mismas, junto con un al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención puede

comprender formas homomultiméricas y/o heteromultiméricas de las proteínas 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 sea 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 según la invención, 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. Con respecto a los tumores y/o cánceres, el tratamiento incluye reducciones en la carga tumoral global y/o el tamaño del tumor individual.

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

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

Las composiciones de diagnóstico de la presente descripción comprenden una proteína de la invención y uno o más agentes promotores de detección. Varios agentes promotores de la detección son conocidos en la técnica, tales como isótopos, colorantes, agentes colorimétricos, agentes potenciadores de contraste, agentes fluorescentes, agentes bioluminiscentes y agentes magnéticos. Estos agentes pueden ser incorporados en la proteína de la invención en cualquier posición. La incorporación del agente puede ser a través de un residuo o residuos de

aminoácidos de la proteína de la invención o a través de algún tipo de unión conocido en la técnica, incluyendo a través de enlazadores y/o quelantes. La incorporación del agente es de tal manera que permite la detección de la presencia de la composición de diagnóstico en una pantalla, ensayo, procedimiento de diagnóstico y/o técnica de imagen.

5 Cuando se produce o fabrica una composición de diagnóstico de la presente descripción, una proteína de la invención puede unirse directa o indirectamente a uno o más agentes promotores de la detección. Hay numerosos agentes promotores de la detección conocidos para el experto que pueden unirse operativamente a las proteínas de la presente invención para los procedimientos de recopilación de información, tales como para aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades, trastornos o afecciones de un organismo (véase, por ejemplo Cai W et al, J Nucl Med 48: 304-10 (2007); Nayak T, Brechbiel M, Bioconjug Chem. 20: 825-41 (2009); Paudyal P et al, Oncol Rep. 22: 115-9 (2009); Qiao J et al, PLoS ONE 6: e18103 (2011); Sano K et al, Breast Cancer Res. 14: R61 (2012)). Por ejemplo, los agentes promotores de la detección incluyen agentes de contraste que mejoran la imagen, tales como colorantes fluorescentes (por ejemplo Alexa680, verde de indocianina y Cy5.5), isótopos y radionúclidos, tales como ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ¹⁸F, ³²P, ⁵¹Mn, ⁵²mMn, ⁵²Fe, ⁵⁵Co, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁷³Se, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁸²mRb, ⁸³Sr, ⁸⁶Y, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁹⁴mTc, ⁹⁴Tc, ⁹⁹mTc, ¹¹⁰In, ¹¹¹In, ¹²⁰I, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁵⁴Gd, ¹⁵⁵Gd, ¹⁵⁶Gd, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵⁸Gd, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, y ²²³Rn, iones paramagnéticos, tales como cromo (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III), metales, tales como lantano (III), oro (III), plomo (II) y bismuto (III), agentes que mejoran el contraste por ultrasonidos, tales como liposomas, agentes radiopacos, tales como compuestos de bario, galio y talio. Los agentes promotores de la detección pueden incorporarse directa o indirectamente usando un grupo funcional intermediario, tales como quelantes como 2-bencil DTPA, PAMAM, NOTA, DOTA, TETA, análogos de los mismos, y equivalentes funcionales de cualquiera de los anteriores (ver Leyton J et al., Clin Cancer Res 14: 7488-96 (2008)).

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

35 Producción o fabricación de una composición farmacéutica y/o de diagnóstico que comprende una proteína de la invención

40 Las sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las proteínas de la presente invención están igualmente dentro del alcance de la presente invención.

45 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.

50 Las proteínas 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 una proteína de la invención, o una sal de la misma, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. (A. Gennaro, ed., 1985)). Tal como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos y agentes que retrasan la absorción, y similares, fisiológicamente aceptables, es decir, compatibles. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los usados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, y transdérmica). Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de

materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En ciertas realizaciones, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración seleccionada, la proteína de la invención 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 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 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 y similares. También pueden ser deseables agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

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

En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o una combinación de diferentes proteínas de la invención, o un éster, sal o amida de cualquiera de los anteriores, y al menos un vehículo 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 y similares. 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 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.

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

20 Tal como se describe en otra parte en el presente documento, una proteína de la presente invención o composición de la misma (por ejemplo, composición farmacéutica o de diagnóstico) se pueden preparar con vehículos que protegerán la composición contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de liberación microencapsulada. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de 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)).

25 En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención (por ejemplo, composición farmacéutica o de diagnóstico) puede formularse para asegurar una distribución deseada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica excluye muchos compuestos grandes y/o hidrófilos. Para direccionar una proteína terapéutica o composición de la invención a una localización particular *in vivo*, se puede 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; p120 catenina y similares.

35 Las composiciones farmacéuticas incluyen formulaciones parenterales diseñadas para ser utilizadas como implantes o sistemas de partículas. Los ejemplos de implantes son formulaciones de depósito compuestas de componentes poliméricos o hidrófobos, tales como emulsiones, resinas de intercambio iónico y soluciones de sales solubles. Ejemplos de sistemas de partículas son dendrímeros, liposomas, microesferas, micropartículas, nanocápsulas, nanopartículas, nanovaras, nanoesferas, micelas poliméricas y nanotubos (véase, por ejemplo Honda M et al, Int J Nanomedicine. 8: 495-503 (2013); Sharma A et al, Biomed Res Int 2013: 960 821 (2013); Ramishetti S, Huang L, Ther Deliv 3: 1429-1445 (2012)). Las formulaciones de liberación controlada se pueden preparar utilizando polímeros sensibles a iones, tales como, por ejemplo, liposomas, polaxámero 407 e hidroxiapatita. Las formulaciones de partículas y de polímero pueden comprender un agente o agentes de alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, tal como, por ejemplo, diversos péptidos y proteínas como citolisinas, agentes derivados de toxina, agentes derivados de virus, péptidos biomiméticos sintéticos y agentes químicos (véase, por ejemplo Varkouhi et al., J control Release 151: 220-8 (2011); J Pirie C et al, Mol cáncer Ther 12: 1774-1782 (2013)).

VII. Polinucleótidos, vectores de expresión y células huésped

50 Más allá de las proteínas de la presente invención, los polinucleótidos que codifican tales proteínas están dentro del alcance de la presente invención. El término "polinucleótido" es equivalente al término "ácidos nucleicos", los cuales incluyen 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 monocatenario, bicatenario o tricatenario. Los polinucleótidos divulgados se describen específicamente para incluir todos los polinucleótidos capaces de codificar una proteína de ejemplo de la invención, por ejemplo, teniendo en cuenta la variación que se sabe que se tolera en la tercera posición de los codones de ARN, pero que codifica el mismo aminoácido como un codón de ARN diferente (véase Stothard P, Biotechniques 28: 1102-4 (2000)).

60 En un aspecto, la invención proporciona polinucleótidos que codifican una proteína de la invención. Los polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido 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 de la invención. La invención también incluye polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas con un polinucleótido que codifica

una proteína de la invención, o un fragmento o derivado de la misma, o el antisentido o complemento de cualquiera de tales secuencias.

5 Los derivados o análogos de los polinucleótidos (o proteínas) de la invención incluyen, entre otros, moléculas de polinucleótidos (o polipéptidos) que tienen regiones que son sustancialmente homólogas a los polinucleótidos o proteínas de la invención, por ejemplo 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 polinucleótidos o polipéptidos del mismo tamaño o en comparación con una secuencia alineada en la que la alineación se realiza mediante un programa informático de homología conocido en la técnica. Un programa de ejemplo es el programa GAP
10 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park, 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 hibridarse con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas de la invención en condiciones rigursas (véase, por ejemplo, Ausubel F et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Nueva York, NY, EE. UU., 1993)), y por debajo. Los
15 expertos en la materia conocen condiciones rigurosas y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY, EE. UU., Cap. 6.3.1-6.3.6 (1989)).

La presente invención proporciona además vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos dentro del alcance de la invención. Los polinucleótidos capaces de codificar las proteínas de la invención pueden insertarse en
20 vectores conocidos, que incluyen plásmidos bacterianos, vectores virales y vectores de fago, usando material y procedimientos bien conocidos en la técnica para producir vectores de expresión. Dichos vectores de expresión incluirán los polinucleótidos necesarios para soportar la producción de proteínas contempladas de la invención dentro de cualquier célula huésped de elección o sistemas de expresión libres de células (por ejemplo, pTxb1 y pIVEX2.3 descritos en los Ejemplos a continuación). Los polinucleótidos específicos que comprenden vectores de
25 expresión para usar con tipos específicos de células huésped o sistemas de expresión libres de células son bien conocidos por un experto en la materia, pueden determinarse usando experimentación de rutina o pueden adquirirse.

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

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

El término "célula huésped" se refiere a una célula que puede apoyar la replicación o expresión del vector de
55 expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas, como E. coli o células eucariotas (por ejemplo, células de levadura, insecto, anfibio, ave o mamífero). La creación y el aislamiento de líneas celulares huésped que comprenden un polinucleótido de la invención o que son capaces de producir una proteína de la invención se pueden lograr usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

Las proteínas dentro del alcance de la presente invención pueden ser variantes o derivados de las proteínas
60 descritas en este documento, dentro del alcance de las reivindicaciones, que son producidas por la modificación del polinucleótido que codifica una proteína descrita de la invención mediante la alteración de uno o más aminoácidos o eliminación o inserción de uno o más aminoácidos que pueden hacerla más adecuada para lograr las propiedades deseadas, tal como una expresión más óptima por una célula huésped.

65 VIII Dispositivos de administración y kits

En ciertas realizaciones, la descripción se refiere a un dispositivo que comprende una o más composiciones de materia de la invención, tal como una composición farmacéutica, para la administración a un sujeto. Por lo tanto, se pueden usar dispositivos de administración que comprenden uno o más compuestos de la invención para administrar a un paciente una composición de materia de la invención mediante diversos procedimientos de administración, que incluyen: inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal; administración oral; administración transdérmica; administración pulmonar o transmucosa; administración por implante, bomba osmótica, cartucho o microbomba; o mediante otros medios reconocidos por una persona experta en la técnica.

También dentro del alcance de la descripción están kits que comprenden al menos una composición de materia de la invención, y opcionalmente, el envase y las instrucciones de uso. Los kits pueden ser útiles para la administración de medicamentos y/o la recopilación de información de diagnóstico. Un kit de la descripción puede comprender opcionalmente al menos un reactivo adicional (por ejemplo, patrones, marcadores y similares). Los kits generalmente incluyen una etiqueta que indica el uso previsto del contenido del kit. El kit puede comprender además reactivos y otras herramientas para detectar un tipo de célula (por ejemplo, célula tumoral) en una muestra o en un sujeto, o para diagnosticar si un paciente pertenece a un grupo que responde a una estrategia terapéutica que hace uso de un compuesto, composición o procedimiento relacionado de la invención, tal como se describe en el presente documento.

IX. Procedimiento para usar una proteína de la invención o una composición de la misma

En general, un objeto de la invención es 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, infecciones microbianas u otras afecciones patológicas mencionadas en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos para usar las proteínas y las composiciones farmacéuticas de la invención para la eliminación dirigida de células, tal como se define en las reivindicaciones. La descripción también proporciona procedimientos para suministrar materiales exógenos adicionales en las células diana, para marcar los interiores de las células diana, para recopilar información de diagnóstico y para tratar enfermedades, trastornos y afecciones, tal como se describe en el presente documento.

En particular, un objeto de la invención es proporcionar dichos 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 para usar proteínas de la invención caracterizadas por secuencias de polipéptidos específicas y composiciones farmacéuticas de las mismas, tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias de polipéptidos en SEQ ID NOs: 1-31 puede utilizarse específicamente como un componente de la proteína utilizada en los siguientes procedimientos.

La presente invención proporciona procedimientos *in vitro* para destruir una célula que comprende la etapa de poner en contacto la célula, *in vitro*, con una proteína o composición farmacéutica de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. Las proteínas y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para matar un tipo de célula específico al contactar una célula o células con una de las composiciones de materia reivindicadas. En ciertas realizaciones, se puede usar una proteína o composición farmacéutica de la presente invención para matar tipos de células específicos 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 o composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para destruir células cancerosas en una mezcla de diferentes tipos de células. En ciertas realizaciones, se puede usar una proteína o composición farmacéutica de la presente invención para matar tipos de células específicos en una mezcla de diferentes tipos de células, tales como tejidos previos al trasplante. En ciertas realizaciones, una proteína o composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para matar tipos de células específicos en una mezcla de tipos de células, tales como material tisular de preadministración con fines terapéuticos. En ciertas realizaciones, una proteína o composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para matar selectivamente células infectadas por virus o microorganismos, o de otra manera, matar selectivamente células que expresan una biomolécula diana extracelular particular, tal como una biomolécula de superficie celular. Las proteínas y las composiciones farmacéuticas de la invención tienen aplicaciones variadas, que incluyen, por ejemplo, usos en el agotamiento de tipos de células no deseadas de tejidos *in vitro* o *in vivo*, usos en la modulación de respuestas inmunes para tratar la enfermedad de injerto contra huésped, usos 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 o composición farmacéutica de la presente invención, solas o en combinación con otros compuestos o composiciones farmacéuticas, pueden mostrar una potente actividad de eliminación celular cuando se administra a una población de células, *in vitro* o *in vivo* en un sujeto, tal como en un paciente que necesita tratamiento. Al dirigir el suministro de regiones de toxina Shiga enzimáticamente activas utilizando regiones de unión de tipo de inmunoglobulina de alta afinidad a los tipos de células cancerosas, esta potente actividad de eliminación

celular puede restringirse a matar 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.

5 La presente descripción proporciona un procedimiento para matar una célula en un paciente, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente que lo necesita al menos una proteína de la presente invención o una composición farmacéutica de la misma.

10 Ciertas realizaciones de las proteínas de la invención o composiciones farmacéuticas de las mismas se pueden usar para matar una célula cancerosa y/o tumoral en un paciente reconociendo una biomolécula extracelular que se encuentra físicamente acoplada con una célula cancerosa y/o tumoral. Los términos "célula cancerosa" o "célula de cáncer" se refieren a varias células neoplásicas que crecen y se dividen de manera anormalmente acelerada y serán claras para la persona experta. El término "célula tumoral" incluye células malignas y no malignas (por ejemplo, células tumorales benignas no cancerosas, células madre "de cáncer" no cancerosas, células madre tumorales, células iniciadoras de cáncer premalignas, células iniciadoras de tumores, o células tumorigénicas, las cuales pueden dar lugar a células hijas que se convierten en células tumorales malignas y/o cancerosas, pero no pueden hacer metástasis por sí mismas (véase, por ejemplo, Martínez-Climent J et al., Haematologica 95: 293-302 (2010)). En general, los cánceres y/o tumores pueden definirse como enfermedades, trastornos o afecciones susceptibles de tratamiento y/o prevención. Los cánceres y tumores (ya sean malignos o no malignos) que están compuestos por células cancerosas y/o células tumorales que pueden beneficiarse de los procedimientos y composiciones de la invención serán claras para la persona experta. Las células neoplásicas a menudo se asocian con uno o más de los siguientes: crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión local de tejidos, angiogénesis y metástasis.

25 Ciertas realizaciones de las proteínas de la invención o composiciones farmacéuticas de las mismas pueden usarse para matar una célula inmune (ya sea sana o maligna) en un paciente reconociendo una biomolécula extracelular encontrada físicamente acoplada con una célula inmune.

30 Ciertas realizaciones de las proteínas de la invención o composiciones farmacéuticas de las mismas pueden usarse para matar una célula infectada en un paciente reconociendo una biomolécula extracelular que se encuentra físicamente acoplada con una célula infectada.

35 Está dentro del alcance de la presente descripción utilizar la proteína 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 B y/o células T malignas infectadas, neoplásicas o, en cualquier caso, no deseadas y a continuación reinfundir el material agotado de células B y/o células T en el paciente (véase, por ejemplo, van Heeckeren W et al., Br J Haematol 132: 42-55 (2006); Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).

40 Está dentro del alcance de la presente descripción utilizar la proteína de la invención o la composición farmacéutica de la misma con el propósito de agotar ex vivo de células B y/o células T de poblaciones de células aisladas extraídas de un paciente. En un ejemplo no limitativo, la proteína de la descripción puede usarse en un procedimiento para la profilaxis del rechazo de trasplante de órganos y/o tejidos en el que el órgano o tejido donante se perfunde antes del trasplante con una proteína citotóxica de la invención o una composición farmacéutica de la misma para purgar el órgano de las células B y/o células T de donantes no deseadas (véase, por ejemplo, Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).

45 También está dentro del alcance de la presente descripción utilizar la proteína de la invención o la composición farmacéutica de la misma con el propósito de agotar las células B y/o las células T de una población de células donantes como una profilaxis contra la enfermedad de injerto frente a huésped e inducción de tolerancia en un paciente para someterse a un trasplante de médula ósea o de células madre.

50 Ciertas realizaciones de la proteína de la invención o composiciones farmacéuticas de la misma pueden usarse para matar una célula infectada en un paciente al reconocer una biomolécula extracelular que se encuentra físicamente acoplada con una célula infectada.

55 Ciertas realizaciones de la proteína de la invención o composiciones farmacéuticas de la misma pueden usarse para matar una célula o células de un parásito multicelular. En ciertas realizaciones adicionales, la muerte celular tiene lugar mientras el parásito multicelular está presente en un organismo o sujeto huésped. En ciertas realizaciones adicionales, la proteína de la invención puede usarse para matar un helminto, tal como, por ejemplo, un plathelmintho, nematelminto, cestodo, mongéneas, nematodo, y/o trematodo.

60 Además, la presente invención proporciona el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente usando una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una de las proteínas de la presente invención o una composición farmacéutica de la misma, tal como se describe en las reivindicaciones. Las enfermedades, trastornos y afecciones contemplados que se pueden tratar con este procedimiento incluyen cánceres, tumores malignos y tumores no malignos. La administración de una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un compuesto de la

65

invención puede dar como resultado una disminución en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los períodos sin síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la afección de la enfermedad.

5 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 en consideración. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son bien conocidos por los profesionales expertos en las artes médicas. Esta cantidad y el procedimiento de administración pueden adaptarse para lograr una eficacia óptima, y pueden depender de factores, tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores, bien conocidos por los expertos en las técnicas médicas. Los tamaños de dosificación y el régimen de dosificación más apropiados para uso humano pueden guiarse por los resultados obtenidos por la presente invención, y pueden confirmarse en ensayos clínicos diseñados adecuadamente. Se pueden determinar una dosificación eficaz y protocolo de tratamiento por medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y a continuación aumentando la dosis mientras se controlan los efectos, y también variando sistemáticamente el régimen de dosificación. El médico puede tener en cuenta numerosos factores al determinar una dosis óptima para un sujeto determinado. Dichas consideraciones son conocidas por la persona experta.

Una ruta de administración aceptable puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, que incluye pero no se limita a aerosol, enteral, nasal, oftálmico, oral, parenteral, rectal, vaginal o transdérmico (por ejemplo, administración tópica de una crema, gel o pomada, o por medio de un parche transdérmico). La "administración parenteral" se asocia típicamente con la inyección en o en comunicación con el sitio de acción previsto, incluida la administración por inyección intratumoral, infraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardíaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, transmucosa o transtraqueal.

Para la administración de una composición farmacéutica de la invención, el intervalo de dosificación será generalmente de aproximadamente 0,0001 a 100 miligramos por kilogramo (mg/kg), y más habitualmente de 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Las dosis de ejemplo pueden ser de 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 de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo es una administración una o dos veces al día, o una administración una o dos veces a la 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 dosis pueden ser seleccionadas y reajustadas por el profesional de la salud calificado según sea necesario para maximizar el beneficio terapéutico para un paciente en particular.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se administrarán típicamente al mismo paciente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, de 2 a 5 días, semanalmente, mensualmente, cada dos o tres meses, cada seis meses o anualmente. Los intervalos entre administraciones también pueden ser irregulares, en función de la regulación de los niveles en sangre u otros marcadores en el sujeto o paciente. Los regímenes de dosificación para un compuesto de la 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 o 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 puede administrarse a través de una o más vías de administración, usando uno o más de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como entenderá el experto, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración para las proteínas de la presente invención o sus composiciones incluyen, por ejemplo, vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo, mediante inyección o infusión en o en comunicación con el sitio de acción deseado (por ejemplo, inyección intratumoral). En otras realizaciones, una composición proteica o farmacéutica de la invención puede administrarse por una ruta no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasalmente, oralmente, vaginalmente, rectalmente, sublingualmente o tópicamente.

Las proteínas o composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse con uno 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. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención se encuentran en la técnica, que incluyen, por ejemplo, bombas de microinfusión implantables para suministro de velocidad controlada; dispositivos para administrar a través de la piel; bombas de infusión para suministro a una velocidad de infusión precisa; dispositivos de infusión implantables de flujo variable para suministro continuo de fármacos; y sistemas de suministro de fármacos osmóticos. Estos y otros implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

Una proteína o composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse sola o en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Una terapia de combinación puede incluir una proteína de la invención o una composición farmacéutica de la misma combinada con al menos otro agente terapéutico

seleccionado en función del paciente particular, enfermedad o afección a tratar. Los ejemplos de otros agentes incluyen, entre otros, un agente citotóxico, anticancerígeno o quimioterapéutico, un agente antiinflamatorio o antiproliferativo, un agente antimicrobiano o antiviral, factores de crecimiento, citocinas, un analgésico, una molécula pequeña o polipéptido terapéuticamente activos, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo clásico o fragmento del mismo, o una molécula de ácido nucleico que modula una o más vías señalización, y agentes terapéuticos de modulación similares que pueden complementarse o ser beneficiosos en un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico.

El tratamiento de un paciente con una proteína o composición farmacéutica de la invención conduce preferiblemente a la muerte celular de las células diana y/o la inhibición del crecimiento de las células diana. Como tales, las proteínas de la invención y las composiciones farmacéuticas que las comprenden serán útiles en procedimientos para tratar una variedad de trastornos patológicos en los que matar o agotar las células diana puede ser beneficioso, tales como, entre otros, cánceres y tumores. La presente descripción proporciona procedimientos para suprimir la proliferación celular y tratar trastornos celulares, que incluyen neoplasia, células B hiperactivas y células T hiperactivas.

En ciertas realizaciones, las proteínas y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para tratar o prevenir cánceres o tumores (malignos y no malignos). En otro aspecto, el procedimiento *ex vivo* anterior se puede combinar con el procedimiento *in vivo* anterior para proporcionar procedimientos de tratamiento o prevención del rechazo en receptores de trasplante de médula ósea, y para lograr tolerancia inmunológica.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona el tratamiento de tumores malignos o neoplasias y otros cánceres asociados a células sanguíneas en un sujeto mamífero, tal como un ser humano, usando una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína o composición farmacéutica de la invención, tal como se define en las reivindicaciones.

Las proteínas y composiciones farmacéuticas de la invención tienen aplicaciones variadas, que incluyen, por ejemplo, usos en la eliminación de células B y/o células T no deseadas, usos en la modulación de respuestas inmunes para tratar enfermedades de injerto contra huésped, usos como agentes antivirales, usos como agentes antimicrobianos y usos en la purga de tejidos de trasplante de tipos de células no deseados. Las proteínas y las 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 del cáncer o células tumorales.

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

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

Está dentro del alcance de la presente descripción proporcionar una profilaxis o tratamiento para enfermedades o afecciones mediadas por células B y/o células T, implicando la profilaxis o tratamiento administrar la proteína de la invención, o una composición farmacéutica de la misma, a un paciente que lo necesite con el fin de matar células B y/o células T 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 descripción proporcionar un receptor de médula ósea para la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad del huésped contra el injerto a través de la eliminación dirigida de células B, células NK y/o células T del huésped usando una proteína o composición farmacéutica de la presente invención (véase, por ejemplo, Sarantopoulos S et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 21: 16-23 (2015)).

Las proteínas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en un procedimiento para tratar el cáncer que comprende administrar a un paciente, que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de la proteína o una composición farmacéutica de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el cáncer que se trata se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer gastrointestinal (tal como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (tal como cánceres de ovario y de testículo), cáncer glandular

(como cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de glándulas salivales o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza y cuello (como cáncer nasofaríngeo, cáncer oral o faríngeo), cáncer de riñón-tracto urinario (como cáncer de vejiga y cáncer renal), cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura (como mesotelioma, carcinoma de pulmón de células pequeñas o carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata, sarcoma (como angiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi o sarcoma sinovial), cáncer de piel (como el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas o el melanoma) y el cáncer uterino.

En un aspecto de la descripción, las proteínas y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en un procedimiento para tratar un trastorno inmunitario que comprende administrar a un paciente, que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína o una composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente descripción, el trastorno inmunitario está relacionado con una inflamación asociada con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa y vasculitis.

Entre ciertas realizaciones de la presente invención está usar la proteína de la invención como un componente de una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento o prevención de un cáncer o un tumor. La descripción además proporciona tratamiento o prevención de una anomalía en el crecimiento, trastorno inmunitario y/o infección microbiana. Por ejemplo, los trastornos inmunes que se presentan en la piel de un paciente pueden tratarse con dicho medicamento en un esfuerzo por reducir la inflamación. En otro ejemplo, los tumores de piel pueden tratarse con dicho medicamento en un esfuerzo por reducir el tamaño del tumor o eliminarlo por completo.

Ciertas proteínas de la invención pueden usarse en aplicaciones de neurocirugía molecular, tales como inmunolesión y rastreo neuronal (véase, Wiley R, Lappi D, Adv Drug Deliv Rev 55: 1043-54 (2003), para revisión). Por ejemplo, el dominio de reconocimiento puede seleccionarse o derivarse de varios ligandos, tales como neurotransmisores y neuropéptidos, que reconocen tipos de células neuronales específicas mediante la unión a receptores de superficie neuronal, tales como un receptor acoplado a proteína G específico del circuito neuronal. De manera similar, el dominio de reconocimiento puede seleccionarse o derivarse de anticuerpos que se unen a receptores de superficie neuronal. Debido a que las toxinas Shiga dirigen de manera robusta su propio transporte axonal retrógrado, ciertas proteínas citotóxicas de la invención pueden usarse para matar una neurona o neuronas que expresan la diana extracelular en un sitio de inyección de proteína citotóxica distante del cuerpo celular (ver Llewellyn-Smith I et al., J. Neurosci Methods 103: 83-90 (2000)). Estas proteínas citotóxicas de reconocimiento específicas para el tipo de célula neuronal tienen usos en la investigación en neurociencia, tal como para dilucidar los mecanismos de las sensaciones (ver, por ejemplo, Mishra S, Hoon M, Science 340: 968-71 (2013)) y crear sistemas modelo de enfermedades neurodegenerativas, tales como como Parkinson y Alzheimer (ver, por ejemplo, Hamlin A et al., PLoS One e53472 (2013)).

Entre ciertas realizaciones de la presente descripción se encuentra un procedimiento de uso de una proteína, composición farmacéutica y/o composición de diagnóstico de la invención para detectar la presencia de un tipo celular con el fin de recopilar información con respecto a enfermedades, afecciones y/o trastornos. El procedimiento comprende poner en contacto una célula con una cantidad diagnósticamente suficiente de una proteína de la invención para detectar la proteína mediante un ensayo o técnica de diagnóstico. El término "cantidad diagnósticamente suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona detección adecuada y medición precisa para fines de recopilación de información mediante el ensayo particular o la técnica de diagnóstico utilizada. En general, la cantidad diagnósticamente suficiente para el uso de diagnóstico *in vivo* de todo el organismo será una dosis no acumulativa de entre 0,1 mg y 100 mg de proteína unida al agente promotor de la detección por kg de sujeto por sujeto. Típicamente, la cantidad de proteína de la invención utilizada en estos procedimientos de recopilación de información será tan baja como sea posible siempre que sea una cantidad diagnósticamente suficiente. Por ejemplo, para la detección *in vivo* en un organismo, la cantidad de proteína de la invención administrada a un sujeto será lo más baja posible.

El reconocimiento específico de tipo celular de proteínas de la invención combinado con agentes promotores de detección proporciona una forma de detectar y formar imágenes de células físicamente acopladas con una biomolécula diana extracelular de una región de unión de las proteínas de la invención. La obtención de imágenes de células que usan las proteínas de la invención puede realizarse *in vitro* o *in vivo* mediante cualquier técnica adecuada conocida en el sector. Por ejemplo, la descripción proporciona un procedimiento para usar una proteína, composición farmacéutica o composición de diagnóstico de la invención para detectar la presencia de un tipo celular con el propósito de recopilar información que puede realizarse en células *in vivo* dentro de un paciente, incluyendo en células *in situ*, por ejemplo, en un lugar de enfermedad, en células *in vitro* y/o en un entorno *ex vivo* en células y tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, un material de biopsia.

La información de diagnóstico se puede recopilar usando varios procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen imágenes de todo el cuerpo de un organismo o usando muestras *ex vivo* tomadas de un organismo. El término muestra que se usa en el presente documento se refiere a cualquier cantidad de cosas, pero no se limita a, fluidos, tales como sangre, orina, suero, linfa, saliva, secreciones anales, secreciones vaginales y semen, y tejidos obtenidos mediante procedimientos de biopsia. Por ejemplo, se pueden utilizar varios agentes promotores de detección para la obtención de imágenes de tumores *in vivo* no invasivos mediante técnicas, tales como imágenes de resonancia magnética (IRM), procedimientos ópticos (tales como imágenes directas, fluorescentes y bioluminiscentes), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión de un solo fotón (SPECT), ultrasonido, tomografía computarizada de rayos X y combinaciones de las mencionadas anteriormente (ver Kaur S et al., *Cancer Lett* 315: 97-111 (2012), para revisión).

La descripción proporciona un procedimiento para usar una proteína, composición farmacéutica o composición de diagnóstico de la invención para detectar la presencia de un tipo de célula positiva en una biomolécula diana con el fin de recopilar información en células *in vivo* dentro de un paciente, en células *in situ*, por ejemplo, en un lugar de enfermedad, en células *in vitro* y/o en un entorno *ex vivo* en células y tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, un material de biopsia. La detección de células específicas, tipos de células y poblaciones de células usando una composición de la invención puede usarse para el diagnóstico y la obtención de imágenes de células, tales como, por ejemplo, células tumorales, cancerosas, inmunes e infectadas. Por ejemplo, las proteínas de la invención y las composiciones de diagnóstico de la descripción pueden emplearse para obtener imágenes o visualizar un sitio de posible acumulación de células que expresan biomoléculas diana en un organismo. Estos procedimientos pueden usarse para identificar sitios de desarrollo tumoral o células tumorales residuales después de una intervención terapéutica.

Ciertas realizaciones del procedimiento usado para detectar la presencia de un tipo de célula pueden usarse para recopilar información sobre enfermedades, trastornos y afecciones, tales como, por ejemplo, cáncer de hueso (tal como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico (tal como cáncer cerebral, neurofibromatosis o glioblastoma), cáncer gastrointestinal (tal como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (tal como cáncer de ovario y cáncer testicular, cáncer glandular (tal como cáncer pancreático), cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de glándulas salivales o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza y cuello (tal como cáncer nasofaríngeo, cáncer oral o de faringe), cánceres hematológicos (tal como leucemia, linfoma o mieloma), cáncer renal-tracto urinario (tal como cáncer renal y 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 basocelular, carcinoma de células escamosas o melanoma), cáncer uterino, SIDA, amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, autismo, cardiogénesis, enfermedad de Crohn, diabetes, eritematoso, gastritis, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso sistémico, trastornos linfoproliferativos, esclerosis múltiple, miastenia gravis, neuroinflamación, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, shock séptico, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, vasculitis, proliferación celular, inflamación, activación de leucocitos, leucocitos, quimiotaxis de leucocitos, maduración de leucocitos, migración de leucocitos, diferenciación neuronal, leucemia aguda linfoblástica (ALL), leucemia linfocítica aguda/linfoma T (ALL), leucemia mielógena aguda, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), linfoma prolinfocítico de células B, linfoma de Burkitt (BL), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia mielógena crónica (CML-BP), leucemia mieloide crónica (CML), linfoma difuso de células B grandes, linfoma folicular, leucemia de células pilosas (HCL), linfoma de Hodgkin (HL), linfoma intravascular de células B grandes, granulomatosis linfomatoide, linfoma linfoplasmocítico, linfoma MALT, linfoma de células del manto, mieloma múltiple (MM), leucemia de células asesinas naturales, linfoma nodal marginal de células B, linfoma no Hodgkin (LNH), leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma de efusión primaria, leucemia prolinfocítica, leucemia promielocítica, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de la zona marginal esplénica, linfoma de células T (TCL), enfermedad de la cadena pesada, gammapatía monoclonal, enfermedad por depósito de inmunoglobulina monoclonal, síndromes mielodisplásicos (SMD), mieloma múltiple latente y macroglobulinemia de Waldenstrom.

Entre ciertas realizaciones de la presente descripción se encuentra un procedimiento de uso de una proteína, composición farmacéutica y/o composición de diagnóstico para marcar o detectar el interior de células neoplásicas y/o tipos de células inmunes (véase, por ejemplo, Koyama Y et al., *Clin Cancer Res* 13: 2936-45 (2007); Ogawa M et al., *Cancer Res* 69: 1268-72 (2009); Yang L et al., *Small* 5: 235-43 (2009)). En base a la capacidad de las proteínas y composiciones farmacéuticas de la invención para entrar en tipos de células específicas y enrutarse dentro de las células a través del transporte intracelular retrógrado, los compartimentos interiores de tipos de células específicos se marcan para su detección. Esto se puede realizar en células *in situ* dentro de un paciente o en células y tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

Las composiciones de diagnóstico de la descripción pueden usarse para caracterizar una enfermedad, trastorno o afección como potencialmente tratable por una composición farmacéutica relacionada de la invención. Ciertas composiciones de la materia de la invención pueden usarse para determinar si un paciente pertenece a un grupo

que responde a una estrategia terapéutica que hace uso de un compuesto, composición o procedimiento relacionado de la invención, tal como se describe en el presente documento, o si es adecuado para usar un dispositivo de suministro de la descripción.

5 Las composiciones de diagnóstico de la descripción pueden usarse después de detectar una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, para caracterizarla mejor, tal como para monitorizar metástasis distante, heterogeneidad y etapa de progresión del cáncer. La evaluación fenotípica del trastorno de la enfermedad o infección puede ayudar al pronóstico y la predicción durante la toma de decisiones terapéuticas. En la recurrencia de la enfermedad, pueden usarse ciertos procedimientos de descripción para determinar si hay un problema local o sistémico.

10 Las composiciones de diagnóstico de la descripción pueden usarse para evaluar las respuestas a los agentes terapéuticos independientemente del tipo de agente terapéutico, por ejemplo, fármaco de molécula pequeña, fármaco biológico o terapia basada en células. Por ejemplo, ciertas realizaciones de los diagnósticos de la descripción pueden usarse para medir cambios en el tamaño del tumor, cambios en las poblaciones de células
15 positivas para el antígeno, incluyendo el número y la distribución, y/o controlar un marcador diferente al antígeno dirigido por una terapia que ya se está administrando a un paciente (véase, por ejemplo, Smith-Jones P et al., Nat Biotechnol 22: 701-6 (2004); Evans M et al., Proc Natl Acad Sci USA 108: 9578-82 (2011)).

20 En ciertas realizaciones, las proteínas de la descripción o las composiciones farmacéuticas y/o diagnósticas de las mismas se usan tanto para diagnóstico como para tratamiento, o para diagnóstico solo.

La presente invención, tal como se define en las reivindicaciones, 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
25 inmunoglobulina capaces de unión a biomoléculas diana extracelulares físicamente acopladas a tipos de células específicas.

EJEMPLOS

30 Los siguientes ejemplos demuestran ciertas realizaciones de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden, ni deben interpretarse, como completamente 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.

35 Los siguientes ejemplos demuestran la capacidad mejorada de proteínas citotóxicas de ejemplo de destruir selectivamente células acopladas físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de tipo inmunoglobulina, en comparación con sus variantes de proteína de orientación inversa. Las proteínas citotóxicas de ejemplo se unieron a las biomoléculas diana expresadas por los tipos de células diana y entraron en las células
40 diana. Las proteínas citotóxicas internalizadas enrutaron efectivamente sus regiones efectoras de toxina Shiga al citosol para inactivar los ribosomas y posteriormente causaron la muerte apoptótica de las células diana.

Una proteína citotóxica de ejemplo comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga recombinado con una región de unión de fragmento variable de cadena única capaz de unirse a CD38 con alta afinidad. Esta proteína
45 citotóxica de ejemplo es capaz de destruir selectivamente las células que expresan CD38 en su superficie. Una segunda proteína citotóxica de ejemplo comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga recombinado con una región de unión de fragmento variable de cadena única capaz de unirse a HER2 con alta afinidad. Esta segunda proteína citotóxica de ejemplo es capaz de destruir selectivamente las células que expresan HER2 en su superficie. Una tercera proteína citotóxica de ejemplo comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga recombinado con una región de unión de fragmento variable de cadena única capaz de unirse a CD19 con alta
50 afinidad. Esta tercera proteína citotóxica de ejemplo es capaz de destruir selectivamente las células que expresan CD19 en su superficie. Una cuarta proteína citotóxica de ejemplo comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga A recombinado con una región de unión de fragmento variable de cadena única capaz de unirse a CD74 con alta afinidad. Esta cuarta proteína citotóxica de ejemplo es capaz de destruir selectivamente las células que
55 expresan CD74 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 el receptor de células inmunes CCR5.

60 **Ejemplo 1. Proteína citotóxica dirigida a CD38 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT1A:: α CD38scFv)**

La proteína citotóxica de este ejemplo SLT-1A:: α CD38scFv comprende un fragmento de la subunidad A de la toxina Shiga recombinada con una región de unión de un fragmento variable de cadena única capaz de unirse a CD38 con alta afinidad de modo que la región efectora de la toxina Shiga esté más próxima al extremo amino terminal de la
65 proteína citotóxica que la región de unión a CD38.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD38scFv

5 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 α CD38scFv se derivó del anticuerpo monoclonal α CD38 HB7 (Peng et al., Blood 101: 2557-62 (2003); véase también GenBank Accession BD376144, Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE. UU.), de modo que se crea un fragmento variable de
10 cadena única (scFv) con las dos regiones variables de inmunoglobulina (V_L y V_H) separadas por un enlazador conocido en la técnica.

15 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 enlazador, tal como una "bisagra murina", derivado de una molécula de IgG3 murina (u otros enlazadores conocidos por el experto) y en marco con un polinucleótido que codifica la región de unión de tipo inmunoglobulina α 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 empezó con un polinucleótido que
20 codificaba un Strep-tag® para facilitar la detección y purificación. La secuencia de polinucleótido que codifica la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD38-scFv 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).

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

30 En este ejemplo de producción de SLT-1A:: α CD38-scFv por un sistema de expresión de *E. coli*, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica SLT-1A:: α CD38-scFv 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 SLT-1A:: α CD38-scFv ligada en marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la proteína 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 SLT-1A:: α CD38scFv se produjo y se purificó de acuerdo
35 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.

40 En este ejemplo de producción de SLT-1A:: α CD38scFv mediante un sistema de traducción de proteínas libre de células, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica SLT-1A:: α CD38 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 SLT-1A:: α CD38scFv 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 los tipos de células dirigidas a la unión de SLT-1A:: α CD38scFv

Las características de unión de la proteína SLT-1A:: α CD38scFv 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 1X PBS + BSA al 1% y se incubaron
55 durante 1 hora a 4 °C con 100 μ L de varias diluciones de la proteína SLT-1A:: α CD38scFv a analizar. Las concentraciones más altas de proteína SLT-1A:: α CD38scFv 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 μ L de 1X PBS + 1% BSA que contenía 0,3 μ g de mAb-FITC α Strep-tag® (# A01736-100, Genscript, Piscataway, NJ, EE. UU.).

60 Las muestras celulares se lavaron a continuación dos veces con 1X PBS + 1% BSA, se resuspendieron en 200 μ 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. Los valores Abs se corrigieron por el ruido de fondo restando los valores Abs medidos para los pocillos solo con PBS. 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 SLT-1A:: α CD38scFv a células CD38+ se midió que fue de aproximadamente 100.000 MFI con una K_D de aproximadamente 13 nM (Tabla 1). Este resultado fue similar a la B_{max} para la unión de la proteína de orientación inversa α CD38scFv::SLT-1A a células CD38+ que se midió que fue aproximadamente 100.000 MFI con una K_D de aproximadamente 17 nM (Tabla 1). Ninguna proteína se unió a células CD38-. Esto demuestra que el efecto "orientación de diseño" probablemente no está relacionado con una alteración de las propiedades de unión de la célula diana del dominio derivado de inmunoglobulina.

Tabla 1. Orientación del diseño no tuvo efecto significativo en las características de unión: los valores representativos para B_{max} y K_D para SLT-1A:: α CD38scFv en comparación con la orientación inversa α CD38scFv::SLT-1A

Proteína citotóxica	Biomolécula diana	Células diana positivas	
		B_{max} (MFI)	K_d (nM)
SLT-1A:: α CD38scFv	CD38	104.000	13,4
α CD38scFv::SLT-1A	CD38	104.000	17,0

Determinación de la concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) de SLT-1A:: α CD38-scFV para ribosomas de eucariotas *in vitro*

La capacidad de inactivación de ribosomas de SLT-1A:: α CD38scFv 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 SLT-1A:: α CD38scFv 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 SLT-1A:: α CD38scFv. Cada muestra en la serie de dilución de la proteína SLT-1A:: α CD38scFv 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 con SLT-1A sola. El porcentaje de proteína de control con SLT-1A sola se calculó mediante $[(IC_{50} \text{ de proteína de control SLT-1A}/IC_{50} \text{ de proteína experimental}) \times 100]$.

El efecto inhibitor de SLT-1A:: α CD38scFv en la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos dependientes de la dosis determinaron que la IC_{50} de SLT-1A:: α CD38scFv 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). Este resultado no fue sustancialmente diferente de la IC_{50} para la proteína de orientación inversa α CD38scFv::SLT-1A, que se midió que fue aproximadamente 15 pM o equivalente del control positivo con solo SLT-1A (tabla 2). Esto demuestra que el efecto "orientación de diseño" probablemente no está relacionado con ninguna alteración significativa de la actividad enzimática de la subunidad A de la toxina Shiga.

Tabla 2. Orientación del diseño no tuvo efecto significativo en la inactivación del ribosoma: concentración inhibidora semimáxima (IC_{50}) representativa de SLT-1A:: α CD38-scFV en comparación con la orientación inversa α CD38-scFV::SLT-1A

Proteína citotóxica	IC_{50} (pM)	IC_{50} de control positivo con solo SLT-1 ^a	Porcentaje de IC_{50} de proteína de control SLT-1A
SLT-1A:: α CD38scFv	13,7	15,0	109,0%
α CD38scFv::SLT-1A	14,8	15,0	99,0%

Determinación de la citotoxicidad selectiva y la Concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) de SLT-1A::αCD38-scFV utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αCD38-scFV 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 la región de unión de tipo inmunoglobulina de proteína citotóxica en comparación con células que no expresan la biomolécula diana. Las células se sembraron (2 x 10³ células por pocillo) en 20 μl de medio en placas de 384 pocillos. La proteína SLT-1A::αCD38-scFV 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 SLT-1A::αCD38-scFV o simplemente tampón, durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). 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 (CD₅₀) para SLT-1A::αCD38-scFV.

Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la CD₅₀ de la proteína SLT-1A::αCD38scFv era aproximadamente 0,2-0,7 nM para las células CD38+ dependiendo de la línea celular en comparación con 470 nM para una línea celular CD38-, que era similar a CD₅₀ para el control negativo solo con SLT-1A (Tabla 3; Figura 2). La CD₅₀ de SLT-1A::αCD38scFv fue aproximadamente 700-3000 veces mayor (menos citotóxico) para las células que no se acoplaron físicamente con la biomolécula diana extracelular CD38 en comparación con las células que se acoplaron físicamente con la biomolécula diana extracelular CD38, por ejemplo, las líneas celulares que expresan CD38 en su superficie celular (Tabla 3; Figura 2). Se midió que la CD₅₀ para los mismos dominios de proteína recombinados en la orientación inversa, αCD38scFv::SLT-1A, fue de aproximadamente 0,8-3,2 nM (Tabla 3; Figura 2). Esto demostró que la orientación mejorada del diseño, donde la región de tipo inmunoglobulina no se localizaba de forma próxima al extremo amino de la proteína citotóxica en relación con dicha región efectora de la toxina Shiga, confirió una mejora en la citotoxicidad de aproximadamente 4-6 veces hacia las células CD38 (Tabla 3). Estos resultados ejemplifican el impacto del efecto de "orientación de diseño" tanto en la citotoxicidad como en la citotoxicidad selectiva. Las diferencias en la eliminación celular de estas proteínas citotóxicas no fueron predecibles en base a los resultados *in vitro* para la inactivación de ribosomas o las características de unión a células diana.

Tabla 3. Orientación del efecto de diseño en la citotoxicidad: Concentraciones citotóxicas semimáximas representativas (CD₅₀) para SLT-1A::αCD38-scFv en comparación con la orientación inversa αCD38-scFv::SLT-1A

Línea celular	Estado CD38	SLT-1A::αCD38-scFv	CD ₅₀ (nM)	
			αCD38-scFv::SLT-1A SLT- 1A	control negativo con SLT-1A solo sólo control negativo
Daudi	positive	0,28	1,08	750
Raji	positive	0,68	3,21	1.100
ST486	positive	0,21	0,75	940
BC-1	positivo	0,18	1,08	510
U226	negativo	470,00	674,00	490

Determinación de la internalización celular de SLT-1A::αCD38scFv y su orientación inversa αCD38scFv::SLT-1A mediante inmunofluorescencia

La capacidad de las proteínas citotóxicas para entrar en las células diana se investigó utilizando técnicas inmunocitoquímicas estándar conocidas en la técnica. Brevemente, 0,8 x 10⁶ células de cada tipo de célula (Raji (CD38 +), Ramos (CD38 +), Daudi (CD38 +), BC-1 (CD38 +) y U266 (CD38-)) fueron recogidas y suspendidas en 50 μL de medio de cultivo celular que contenía un cóctel de inhibidores de la proteasa (por ejemplo, P1860 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.) y la proteína del receptor Fc humano para reducir la tinción inmunofluorescente no específica. A continuación, se añadieron 100 nM de la proteína citotóxica a analizar a las células, y las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora para permitir que progresara la intoxicación. A continuación, las células se "fijaron" y "permeabilizaron" utilizando el Kit Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences San Diego, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La región efectora de la toxina Shiga se "tiñó" usando un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG anti-subunidad A de toxina Shiga 1 de ratón, BEI NR-867 BEI Resources, Manassas, VA, EE. UU.). La localización de anticuerpos monoclonales de ratón se detectó a continuación con el kit de etiquetado de anticuerpos

monoclonales Alexa Fluor® 555 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En este ensayo, se observó la unión a la superficie celular y la internalización celular en células CD38 + tanto para SLT-1A:: α CD38scFv como para la proteína de orientación inversa α CD38scFv::SLT-1A. No se observó internalización celular para ninguna proteína a las células CD38. Esto demostró que las diferencias en la citotoxicidad (Tabla 3; Figura 2) entre estas dos variantes, que difieren solo en el orden relativo de su región de unión de tipo inmunoglobulina y la región efectora de la toxina Shiga, probablemente no estén relacionadas con ningún cambio significativo en la unión de la célula diana y/o entrada celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α CD38scFv::SLT-1A utilizando modelos animales

Se usan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica α CD38scFv::SLT-1A en células neoplásicas CD38+ y/o inmunes. Se usan 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 esos ratones de células neoplásicas humanas y/o inmunes humanas que expresan CD38 en sus superficies celulares.

Ejemplo 2. Una proteína citotóxica dirigida a HER2 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A:: α HER2scFv)

La proteína citotóxica de este ejemplo SLT-1A:: α HER2scFv comprende un fragmento de subunidad de la toxina Shiga A recombinada con una región de unión de fragmento variable de cadena única capaz de unirse a HER2 con alta afinidad de modo que la región efectora de la toxina Shiga esté más próxima al extremo amino de la proteína citotóxica que la región de unión a HER2.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α HER2scFv

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., Mol Cancer 9: 28 (2010)). Una región de unión de tipo inmunoglobulina es α HER2scFv derivado del anticuerpo monoclonal trastuzumab (comercializado como Herceptin®, Genentech, South San Francisco, CA) tal como se ha descrito (Zhao et al., J. Immunol 183: 5563-74, (2009)), de manera que un fragmento variable de cadena única (scFv) con las dos regiones variables de inmunoglobulina (V_L y V_H) separadas por un enlazador.

En este ejemplo, 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 toxina Shiga de SLT-1A (aminoácidos 1-251 de SEQ ID NO: 1) se clonó en marco con un polinucleótido que codifica un enlazador tal como una "bisagra murina" derivada de un molécula de IgG3 murina u otros enlazador conocido por el experto y en marco con un polinucleótido que codifica la región de unión de tipo inmunoglobulina α Her2scFv que comprende los aminoácidos 269-512 de SEQ ID NO: 8. 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 SLT1A:: α HER2scFv 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.).

Se produjo una proteína de fusión expresando el polinucleótido que codifica la proteína citotóxica SLT-1A:: α HER2scFv (SEQ ID NO: 8). La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α HER2scFv se realizó usando un sistema bacteriano conocido en la técnica.

En este ejemplo de producción de SLT-1A:: α HER2scFv mediante un sistema de expresión de *E. coli*, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica SLT-1A:: α HER2scFv 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 SLT-1A:: α HER2scFv ligada en el marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la inteína 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 SLT-1A:: α HER2scFv 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 SLT-1A:: α HER2scFv mediante un sistema de traducción de proteínas libre de células, la secuencia de "inserto" de polinucleótido que codifica SLT-1A:: α HER2scFv 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 SLT-1A::αHER2scFv 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.

Determinación de la unión específica máxima (B_{max}) y constante de equilibrio de unión (K_D) de SLT-1A::αHER2scFv a un tipo de células dirigida

Las características de unión de la proteína SLT-1A::αHER2scFv 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 en solución salina tamponada con fosfato (1X PBS) (Hyclone Brand, Fischer Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) que contenía 1 por ciento de albúmina de suero bovino (BSA) (Calbiochem, San Diego, CA, Estados Unidos), en lo sucesivo referido como "1X PBS + 1% BSA" y se incubaron durante 1 hora a 4 °C con 100 µL de varias diluciones de la proteína SLT-1A::αHER2scFv a analizar. Las concentraciones más altas de proteína SLT-1A::αHER2scFv 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_{max} y K_D utilizando datos corregidos con la línea base. Los valores de Abs se corrigieron de la base mediante la resta de los valores de Abs medidos para pocillos que contenían solo PBS. 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 SLT-1A::αHER2scFv a células HER2+ se midió que fue de aproximadamente 230.000 MFI con una K_D de aproximadamente 110 nM (Tabla 4). Este resultado fue similar a la B_{max} para la unión de la proteína de orientación inversa αHER2scFv::SLT-1A a células HER2+ que se midió que fue aproximadamente 140.000 MFI con una K_D de aproximadamente 180 nM (Tabla 4). Se observó que ninguna proteína presentaba una unión medible a células negativas HER- en este ensayo. Esto demuestra que el efecto "orientación de diseño" probablemente no está relacionado con una alteración de las propiedades de unión de la célula diana del dominio derivado de inmunoglobulina.

Tabla 4. Orientación del diseño no tuvo efecto significativo en las características de unión: los valores representativos para B_{max} y K_D para SLT-1A::HER2scFv en comparación con la orientación inversa αHER2scFv::SLT-1A

Proteína citotóxica	Biomolécula diana	Células diana positivas	
		B _{max} (MFI)	K _d (nM)
SLT-1A::αHER2scFv	HER2	231.000	110
αHER2scFv::SLT-1A	HER2	141.000	182

Determinación de la concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) de "SLT-1A::αHER2scFv para ribosomas de eucariotas in vitro

Las capacidades de inactivación de ribosomas de SLT-1A::HER2scFv se determinaron en un ensayo de traducción de proteínas *in vitro* sin células usando el Kit de Transcripción/Traducción Acoplado Rápido TNT® (L1170 Promega, Madison, WI, EE. UU.). El kit incluye ADN de control de Luciferasa T7 y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad ribosómica se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

Se preparó una serie de diluciones de 10 veces de SLT-1A::HER2scFv para analizar en el tampón apropiado y se creó una serie de componentes de mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de SLT-1A::αHER2scFv. Cada muestra en la serie de dilución de la proteína SLT-1A::HER2scFv se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control Luciferasa T7. Las muestras de prueba se incubaron durante 1,5 horas a 30 °C. Después de la incubación, se agregó el reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE. UU.) a todas las muestras de prueba y la cantidad de traducción de la proteína luciferasa se midió por luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición

traslacional se determinó mediante análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a las unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó el valor de la concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) 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 = Inferior + ((superior-inferior)/(1 + 10 ^ (X-Log IC50)))] bajo el título de inhibición dosis-respuesta. Se calculó la IC₅₀ para las proteínas experimentales y la proteína de control con SLT-1A sola. El porcentaje de proteína de control con SLT-1A sola se calculó mediante [(IC₅₀ de proteína de control SLT-1A/IC₅₀ de proteína experimental) x 100].

El efecto inhibitor de SLT-1A::αHER2scFv sobre la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la IC₅₀ SLT-1A::αHER2scFv en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células fue de aproximadamente 110 pM o dentro del 19% del control positivo solo con SLT-1A (Tabla 5). Este resultado no fue sustancialmente diferente de la IC₅₀ para la proteína de orientación inversa αHER2scFv::SLT-1A, que se midió que fue del 108% del control positivo con solo SLT-1A (Tabla 5). Esto muestra que el efecto de "orientación de diseño" probablemente no esté relacionado con ninguna alteración significativa de la actividad enzimática de la subunidad A de la toxina Shiga.

Tabla 5. Orientación del diseño no tuvo efecto significativo en la inactivación del ribosoma: concentración inhibidora semimáxima (IC₅₀) representativa de SLT-1A::αHER2-scFV en comparación con la orientación inversa αHER2-scFV::SLT-1A

Proteína citotóxica	Porcentaje de IC ₅₀ de proteína de control SLT-1A
SLT-1A::αHER2scFv	119, %
αHER2scFv::SLT-1A	108%

Determinación de la citotoxicidad selectiva y la concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) de SLT-1A::αHER2scFv utilizando un ensayo de eliminación de células

Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αHER2scFv 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 10³ células por pocillo) en 20 µl de medio en placas de 384 pocillos. La proteína SLT-1A::αHER2scFv 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 SLT-1A::αHER2scFv o simplemente tampón, durante 3 días a 37°C y en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂). 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 (CD₅₀) para SLT-1A::αHER2scFv.

Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la CD₅₀ de la proteína SLT-1A::αHER2scFv fue de aproximadamente 0,07 nM para las células HER2+ (Tabla 6; figura 3). La CD₅₀ para los mismos dominios de proteína recombinados en la orientación inversa αHER2scFv::SLT-1A se midió que fue de aproximadamente 0,64 (tabla 6; figura 3). Los resultados para la línea celular HER2- MDA-MB468 fueron ambiguos porque las curvas correctas no se pudieron ajustar a los datos. Los resultados en la tabla 6 y la figura 3 ejemplifican el impacto de la "orientación de diseño" en la citotoxicidad. Las diferencias en la eliminación celular para estas proteínas citotóxicas no eran predecibles en base a los resultados *in vitro* para la inactivación de ribosoma o las características de unión a células diana.

Tabla 6. La orientación del diseño afecta la citotoxicidad: Concentraciones citotóxicas semimáximas representativas (CD₅₀) para SLT-1A::αHER2scFv en comparación con la orientación inversa αHER2scFv::SLT-1A

Línea celular	Estado HER2	CD ₅₀ (nM)		
		SLT-1A::αHER2scFv	αHER2scFv::SLT-1A	control negativo con SLT-1A
HCC-1954	positive	0,070	0,640	2,00
MDA-MB-468	negative	ambiguo	ambiguo	ambiguo

Determinación de la internalización celular de SLT-1A::αCDHER2scFv y su orientación inversa αHER2scFv::SLT-1A mediante inmunofluorescencia

5 La capacidad de las proteínas citotóxicas para entrar en las células diana se investigó usando técnicas inmunocitoquímicas estándar conocidas en la técnica. En resumen, se recogieron $0,8 \times 10^6$ células de cada tipo de célula (SKBR3 (HER2+) y MDA-MB-231 (HER2-)) y se suspendieron en 50 μ L de medio de cultivo celular que contenía un cóctel de inhibidores de la proteasa (por ejemplo, P1860 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE. UU.) y la proteína del receptor Fc humano para reducir la tinción inmunofluorescente no específica. A continuación, se añadieron 100 nM de la proteína citotóxica a analizar a las células, y las células se incubaron a 37 °C durante 1 hora para permitir que progresara la intoxicación. A continuación, las células se "fijaron" y "permeabilizaron" utilizando el Kit Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences San Diego, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La región efectora de la toxina Shiga se "tiñó" usando un anticuerpo monoclonal de ratón (IgG de ratón anti-subunidad de toxina Shiga 1, BEI NR-867 BEI Resources, Manassas, VA, EE. UU.). La localización de anticuerpos monoclonales de ratón se detectó a continuación con el kit de etiquetado de anticuerpos monoclonales Alexa Fluor® 555 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En este ensayo, se observó unión a la superficie celular y la internalización celular en células HER2+ tanto para SLT-1A::αHER2scFv y la proteína de orientación inversa αHER2scFv::SLT-1A (Figura 4). No se observó internalización celular para ninguna proteína a las células HER2. Esto muestra las diferencias en la citotoxicidad (Tabla 6; Figura 3) entre estas dos variantes de proteínas citotóxicas que difieren solo en el orden relativo de su región de unión de tipo inmunoglobulina y la región efectora de la toxina Shiga probablemente no estuvo relacionada con ningún cambio significativo en la unión a la célula diana y/o entrada celular.

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica αHER2scFv::SLT-1A utilizando modelos animales

Se usan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica αHER2scFv::SLT-1A en células neoplásicas HER2+. Se usan 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 esos ratones de células neoplásicas humanas que expresan HER2 en sus superficies celulares.

Ejemplo 3. Una proteína citotóxica dirigida a CD19 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A::αCD19scFv)

La proteína citotóxica de este ejemplo SLT-1A::αCD19scFv comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga recombinado con una región de unión de fragmento variable de cadena única capaz de unirse a CD19 con alta afinidad de modo que la región efectora de la toxina Shiga está más próxima al extremo amino de la proteína citotóxica que la región de unión a CD19.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A::αCD19scFv

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., Mol Cancer 9: 28 (2010)). Una región de unión de tipo inmunoglobulina αCD19scFv se derivó del anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD 19 4G7 (Peipp M et al., J Immunol Methods 285: 265-80 (2004) y referencias en la misma) 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 enlazador conocido en la técnica.

La región de unión y la región efectora de la toxina Shiga se unieron para formar una proteína de fusión. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga de SLT-1A (aminoácidos 1-251 de SEQ ID NO: 1) se clonó en el marco con un polinucleótido que codifica un enlazador, tal como una "bisagra murina" derivada de un molécula de IgG3 murina (y otros enlazadores conocidos por el experto) y en marco con un polinucleótido que codifica la región de unión de tipo inmunoglobulina αCD19scFv que comprende los aminoácidos 269-516 de SEQ ID NO: 12. La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica SLT-1A::αCD19scFv de este ejemplo se optimizó en codones para una expresión eficiente en E. coli utilizando servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, EE. UU.).

Se produjo una proteína de fusión expresando el polinucleótido que codifica la proteína citotóxica SLT-1A::αCD19scFv (SEQ ID NO: 12). La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A::αCD19scFv se realizó usando un sistema bacteriano conocido en la técnica.

En este ejemplo de producción de SLT-1A::αCD 19scFv mediante un sistema de expresión de E. coli, la secuencia de "inserción" polinucleotídica que codifica SLT-1A::αCD19scFv 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 SLT-1A::αCD19scFv ligada en marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la íntima 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 células T7 Shuffle® (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). La proteína SLT-1A::αCD19scFv se produjo y purificó de acuerdo con el manual del sistema IMPACT™ (Purificación mediada por inteína con una etiqueta de unión a quitina de afinidad) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). La purificación se realizó utilizando técnicas estándar conocidas en el sector, tal como la cromatografía de afinidad.

Determinación de la concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) de SLT-1A::αCD19scFv a ribosomas eucariotas *in vitro*

Las capacidades de inactivación de ribosomas de SLT-1A::αCD19scFv se determinaron en un ensayo de traducción de proteínas *in vitro* sin células usando el Kit de Transcripción/Traducción Acoplado Rápido TNT® (L1170 Promega, Madison, WI, EE. UU.). El kit incluye ADN de control de Luciferasa T7 y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad ribosómica se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

Se preparó una serie de diluciones de 10 veces de SLT-1A::αCD19scFv para analizar en el tampón apropiado y se creó una serie de componentes de mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de SLT-1A::αCD19scFv. Cada muestra en la serie de dilución de la proteína SLT-1A::αCD19scFv se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control Luciferasa T7. Las muestras de prueba se incubaron durante 1,5 horas a 30 °C. Después de la incubación, se agregó el reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE. UU.) a todas las muestras de prueba y la cantidad de traducción de la proteína luciferasa se midió por luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición traslacional se determinó mediante análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a las unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó el valor de la concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) para cada muestra.

El efecto inhibitorio de SLT-1A::αCD 19scFv sobre la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la IC₅₀ SLT-1A::αCD19scFv en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células fue de aproximadamente 5,2 pM (Tabla 7). Este resultado no fue sustancialmente diferente de la IC₅₀ para la proteína de orientación inversa αCD19scFv::SLT-1A, que se midió que fue de aproximadamente 3,2 pM o equivalente del control positivo con solo SLT-1A (Tabla 7). Esto muestra que el efecto de "orientación de diseño" probablemente no esté relacionado con ninguna alteración significativa de la actividad enzimática de la subunidad A de la toxina Shiga.

Tabla 7. Orientación del diseño no tuvo efecto significativo en la inactivación del ribosoma: concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) representativa de SLT-1A::αCD19-scFV en comparación con la orientación inversa αCD19-scFV::SLT-1A

Proteína citotóxica	IC ₅₀ (pM)	IC ₅₀ de control positivo con solo SLT-1 ^a
SLT-1A::αCD19scFv	5,2	7,9
αCD19scFv::SLT-1 ^a	3,2	7,9

Determinación de la citotoxicidad selectiva y la concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) de SLT-1A::αCD19scFv utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αCD19scFv se determinaron mediante el siguiente ensayo de eliminación celular. Este ensayo determina la capacidad de una proteína citotóxica para matar células que expresan la biomolécula diana de su región de unión de tipo inmunoglobulina en comparación con las células que no expresan la biomolécula diana. Las células se colocaron en placas (2 x 10³ células por pocillo) en 20 µl de medio de cultivo celular en placas de 384 pocillos. La proteína SLT-1A::αCD19scFv se diluyó 10 veces en tampón y se añadieron 5 µL de las diluciones a las células. Los pocillos de control que contenían solo medio de cultivo celular se usaron para la corrección basal. Las muestras de células se incubaron con SLT-1A::αCD19scFv, o simplemente tampón, durante 3 días a 37 °C y en una atmósfera de 5% de CO₂. La supervivencia celular total o el porcentaje de viabilidad se determinó usando una lectura luminiscente usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7573 Promega Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó utilizando 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 (tres parámetros) para determinar el valor de concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para SLT-1A::αCD19-scFV.

Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la CD₅₀ de la proteína SLT-1A::αCD19scFv era de aproximadamente 0,28 nM para las células Daudi CD19+ (Tabla 8; Figura 5). La CD₅₀ para el control negativo de

SLT-1A solo y los mismos dominios de proteínas recombinados en la orientación inversa, α CD19scFv::SLT-1A, no pudieron medirse con precisión en función de la forma de la curva. La CD_{50} de SLT-1A:: α CD19scFv para las células U266 negativas para CD19 no se pudo calcular debido a la forma de la curva; estas células no están físicamente acopladas con la biomolécula diana extracelular CD19. Estos resultados mostraron que una orientación específica de la ingeniería de proteínas, donde la región de tipo inmunoglobulina no estaba ubicada de forma próxima al extremo amino de la proteína citotóxica en relación con dicha región efectora de toxina Shiga, confirió una mejora en la citotoxicidad hacia las células CD19+ (Tabla 8; Figura 5). Las diferencias en la eliminación de células para estas proteínas citotóxicas no fueron predecibles en función de los resultados *in vitro* para la inactivación de los ribosomas y no se espera que sean predecibles en función de las características de unión a las células diana.

Tabla 8. La orientación de diseño afectó a la citotoxicidad: Concentraciones citotóxicas semimáximas representativas (CD_{50}) de SLT-1A:: α CD19-scFV en comparación con la orientación inversa α CD19-scFV::SLT-1A

Línea celular	Estado CD19	CD_{50} (nM)		
		SLT-1A:: α CD19scFv	α CD19scFv::SLT-1A	control negativo con SLT-1A solo
Daudi	positive	0,28	NC	NC
U266	negative	NC	NC	NC

* "NC" indica no calculable

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD19scFv utilizando modelos animales

Los modelos animales se usan para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD19scFv en células neoplásicas y/o inmunes. Se usan 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 esos ratones de células neoplásicas humanas y/o inmunes humanas que expresan CD 19 en sus superficies celulares.

Ejemplo 4. Una proteína citotóxica dirigida a CD74 derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SLT-1A:: α CD74scFv)

La proteína citotóxica de este ejemplo SLT-1A:: α CD74scFv comprende un fragmento de subunidad A de toxina Shiga A recombinado con una región de unión de fragmento variable de cadena única capaz de unirse a CD74 con alta afinidad de modo que la región efectora de la toxina Shiga esté más próxima al extremo amino de la proteína citotóxica que la región de unión a CD74.

Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD74scFv

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., Mol Cancer 9: 28 (2010). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α CD74scFv se obtuvo del anticuerpo monoclonal humanizado anti-CD74, Milatuzumab (Sapra P et al., Clin Cancer Res 11: 5257-64 (2005) y sus referencias) 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 enlazador conocido en la técnica.

La región de unión y la región efectora de la toxina Shiga se unieron para formar una proteína de fusión. En este ejemplo, un polinucleótido que codifica la región efectora de la toxina Shiga de SLT-1A (aminoácidos 1-251 de SEQ ID NO: 1) se clonó en el marco con un polinucleótido que codifica un enlazador, tal como una "bisagra murina" derivada de un molécula de IgG3 murina (y otros enlazadores conocidos por el experto) y en marco con un polinucleótido que codifica la región de unión de tipo inmunoglobulina α CD74scFv que comprende los aminoácidos 269-518 de la SEQ ID NO: 16. La secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD74scFv de este ejemplo se optimizó en codones para la expresión eficiente en E. coli utilizando los servicios de DNA 2.0, Inc. (Menlo Park, CA, EE. UU.).

Se produjo una proteína de fusión expresando el polinucleótido que codifica la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD74scFv (SEQ ID NO: 16). La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD74scFv se realizó usando un sistema bacteriano conocido en la técnica.

En este ejemplo de producción de SLT-1A:: α CD74scFv mediante un sistema de expresión de E. coli, la secuencia de "inserción" polinucleotídica que codifica SLT-1A:: α CD74scFv se clonó en el vector pTxb1 (New England Biolabs, Ipswich, MA, US) usando procedimientos estándar para producir una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD74scFv ligada en marco a secuencias de polinucleótidos que codifican la inteína 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 células T7 Shuffle@

(New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). La proteína SLT-1A:: α CD74scFv se produjo y purificó de acuerdo con el manual del sistema IMPACT™ (Purificación mediada por inteína con una etiqueta de unión a quitina de afinidad) (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.). La purificación se realizó utilizando técnicas estándar conocidas en el sector, tal como la cromatografía de afinidad.

5 Determinación de la concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) de SLT-1A:: α CD74scFv a ribosomas eucariotas *in vitro*

10 Las capacidades de inactivación de ribosomas de SLT-1A:: α CD74scFv se determinaron en un ensayo de traducción de proteínas *in vitro* sin células usando el Kit de Transcripción/Traducción Acoplado Rápido TNT® (L1170 Promega, Madison, WI, EE. UU.). El kit incluye ADN de control de Luciferasa T7 y la mezcla madre TNT® Quick. La reacción de actividad ribosómica se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para crear mezclas de reacción "TNT".

15 Se preparó una serie de diluciones de 10 veces de SLT-1A:: α CD74scFv para analizar en el tampón apropiado y se creó una serie de componentes de mezcla de reacción TNT idénticos para cada dilución de SLT-1A:: α CD74scFv. Cada muestra en la serie de dilución de la proteína SLT-1A:: α CD74scFv se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT junto con el ADN de control Luciferasa T7. Las muestras de prueba se incubaron durante 1,5 horas a 30 °C. Después de la incubación, se agregó el reactivo de ensayo de luciferasa (E1483 Promega, Madison, WI, EE. UU.) a todas las muestras de prueba y la cantidad de traducción de la proteína luciferasa se midió por luminiscencia de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel de inhibición traslacional se determinó mediante análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de la proteína total frente a las unidades de luminiscencia relativas. Usando software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE.UU.), se calculó el valor de la concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) para cada muestra.

20 El efecto inhibitorio de SLT-1A:: α CD74scFv sobre la síntesis de proteínas libre de células fue fuerte. Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la IC₅₀ SLT-1A:: α CD74scFv en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células fue de aproximadamente 8,7 pM (Tabla 9). Este resultado no fue sustancialmente diferente de la IC₅₀ para la proteína de orientación inversa α CD74scFv::SLT-1A, que se midió que fue de aproximadamente 3,6 pM o equivalente del control positivo con solo SLT-1A (Tabla 9). Esto muestra que el efecto de "orientación de diseño" probablemente no esté relacionado con ninguna alteración significativa de la actividad enzimática de la subunidad A de la toxina Shiga.

35 **Tabla 9. Orientación del diseño no tuvo efecto significativo en la inactivación del ribosoma:** concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) representativa de SLT-1A:: α CD74-scFV en comparación con la orientación inversa α CD74-scFV::SLT-1A

Proteína citotóxica	IC ₅₀ (pM)	IC ₅₀ de control positivo con solo SLT-1 ^a
SLT-1A:: α CD74scFv	8,7	7,9
α CD74scFv::SLT-1 ^a	3,6	7,9

40 Determinación de la citotoxicidad selectiva y la concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) de SLT-1A:: α CD74scFv utilizando un ensayo de eliminación celular

45 Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α CD74scFv se determinaron mediante el siguiente ensayo de eliminación celular. Este ensayo determina la capacidad de una proteína citotóxica para matar células que expresan la biomolécula diana de su región de unión de tipo inmunoglobulina en comparación con la proteína SLT-1A que no posee la región de unión. Las células se colocaron en placas (2 x 10³ células por pocillo) en 20 μ l de medio de cultivo celular en placas de 384 pocillos. La proteína SLT-1A:: α CD74scFv se diluyó 10 veces en tampón y se añadieron 5 μ l de las diluciones a las células. Los pocillos de control que contenían solo medio de cultivo celular se usaron para la corrección basal. Las muestras de células se incubaron con SLT-1A:: α CD74scFv, o simplemente tampón, durante 3 días a 37 °C y en una atmósfera de 5% de CO₂. La supervivencia celular total o el porcentaje de viabilidad se determinó usando una lectura luminiscente usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (G7573 Promega Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad de los pocillos experimentales se calculó utilizando 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 (tres parámetros) para determinar el valor de la concentración citotóxica semimáxima (CD₅₀) para SLT-1A:: α CD74scFv.

60 Los experimentos de dependencia de la dosis determinaron que la CD₅₀ de la proteína SLT-1A:: α CD74scFv fue de aproximadamente 18,7 nM para las células Daudi CD74+ (Tabla 10; figura 6). La CD₅₀ para el control negativo solo con SLT-1A fue de 2026 nM y los mismos dominios de proteína recombinados en la orientación inversa

α CD74scFv::SLT-1A se midió que fue de 95,3 (tabla 10; figura 6). Esto demostró que una orientación particular del diseño de proteínas citotóxicas, donde la región de tipo inmunoglobulina no estaba ubicada de manera próxima al extremo amino de la proteína citotóxica en relación con dicha región efectora de toxina Shiga, confirió una mejora en la citotoxicidad hacia las células CD74+. Las diferencias en la eliminación celular para estas proteínas citotóxicas no fueron predecibles en base a los resultados *in vitro* para la inhibición de la síntesis de proteínas y no se espera que sean predecibles en base a las características de unión a las células diana.

Tabla 10. La orientación del diseño afecta la citotoxicidad: Concentraciones citotóxicas semimáximas representativas (CD_{50}) para SLT-1A:: α CD74scFv en comparación con la orientación inversa α CD74scFv::SLT-1A

Línea celular	Estado CD74	CD_{50} (nM)		
		SLT-1A:: α CD74scFv	α CD74scFv::SLT-1A	control negativo solo con SLT-1A
Daudi	positivo	18,7	95,3	2026

Determinación de los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD74scFv utilizando modelos animales

Se usan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CD74scFv en células neoplásicas CD74+ y/o inmunes. Se usan varias cepas de ratones para probar el efecto de la proteína citotóxica después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones que resultan de la inyección en esos ratones de células neoplásicas humanas y/o inmunes humanas que expresan CD74 en sus superficies celulares.

Resumen

Cuando se probaron cuatro proteínas citotóxicas diferentes que comprendían regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga y regiones de reconocimiento derivadas de inmunoglobulina en sus extremos amino terminales, estas proteínas no mostraron la citotoxicidad esperada predicha por sus características *in vitro* de inactivación de ribosomas y/o unión a diana. Sorprendentemente, se observó que la unión de regiones de unión heterólogas próximas al extremo amino de una fusión de proteínas que comprende una región efectora de toxina Shiga no dio como resultado una citotoxicidad potente en comparación con las mismas dos regiones de polipéptidos unidas en la orientación inversa.

Ejemplo 5. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo α Epstein-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 α Epstein-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:: α EpsteinBarr

La región de unión de tipo inmunoglobulina α Epstein-Barr-antígeno y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina no está situada de forma próxima al extremo amino de la proteína en comparación con la región efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a antígeno de α EpsteinBarr SLT-1A:: α EpsteinBarr. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EpsteinBarr 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:: α EpsteinBarr

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, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B_{max} para SLT-1A:: α EpsteinBarr con respecto a células positivas de antígeno de Epstein-Barr 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 Epstein-Barr en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EpsteinBarr 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 IC₅₀ de SLT-1A:: α EpsteinBarr en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

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

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α EpsteinBarr 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:: α EpsteinBarr 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 CD₅₀ 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 CD₅₀ 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.

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

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α 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.

Ejemplo 6. Proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo α 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 α 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)).

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

La región de unión de tipo inmunoglobulina α Leishmania-antígeno y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina no está situada de forma próxima al extremo amino de la proteína en comparación con la región efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión α Leishmania-antígeno SLT-1A:: α Leishmania. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania 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:: α 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, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B_{max} para SLT-1A:: α Leishmania con respecto 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.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α 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 IC₅₀ de SLT-1A:: α Leishmania en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

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

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α 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:: α 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.

Ejemplo 7. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y la región de unión de tipo inmunoglobulina α 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 α 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:: α NeurotensinR

La región de unión de tipo inmunoglobulina α NeurotensinR y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina no está situada de forma próxima al extremo amino de la proteína en comparación con la región efectora de la toxina Shiga. 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:: α NeurotensinR. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α NeurotensinR 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:: α NeurotensinR

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, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B_{max} para SLT-1A:: α NeurotensinR con respecto a células positivas de receptor de neurotensina 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 receptor de neurotensina en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α 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_{50} de SLT-1A:: α NeurotensinR en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

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

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α 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:: α NeurotensinR se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células negativas de receptor de neurotensina como una comparación con las células positivas de receptor de neurotensina. La CD_{50} de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células positivas de receptor de neurotensina, 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 receptor de neurotensina en una superficie celular, en comparación con células que expresan el receptor de neurotensina en una superficie celular.

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

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α 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.

Ejemplo 8. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y una región de unión de tipo inmunoglobulina α EGFR

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 α 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.

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

La región de unión de tipo inmunoglobulina α EGFR y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina no está situada de forma próxima al extremo amino de la proteína en comparación con la región efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a EGFR SLT-1A:: α EGFR. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α 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:: α 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 basado en fluorescencia, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores. La B_{max} para SLT-1A:: α EGFR con respecto a células EGFR+ 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 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 IC₅₀ de SLT-1A:: α EGFR en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

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

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α EGFR 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:: α EGFR 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 CD₅₀ de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0,01-100 nM para células EGFR+, dependiendo de la línea celular. La CD₅₀ 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:: α EGFR utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α EGFR 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 9. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo α CCR5

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 α CCR5 deriva de un anticuerpo monoclonal contra CCR5 humano (CD195) (Bernstone L et al, Hybridoma 31: 7-19 (2012)). CCR5 se expresa predominantemente en las células T, macrófagos, células dendríticas y microglia. Además, CCR5 juega un papel en la patogénesis y la propagación del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

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

La región de unión de tipo inmunoglobulina α CCR5 y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para

formar una proteína, en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina no está situada de forma próxima al extremo amino terminal de la proteína en comparación con la región efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a α CCR5 SLT-1A:: α CCR5. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CCR5 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:: α CCR5

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 Bmax para SLT-1A:: α CCR5 a células positivas CCR5+ 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 CCR5- en este ensayo.

La capacidad de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CCR5 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:: α CCR5 en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CCR5 utilizando un ensayo de eliminación celular

Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α 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:: α 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:: α CCR5 utilizando modelos animales

Se utilizan modelos animales se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de la proteína citotóxica SLT-1A:: α CCR5 en el agotamiento de células T de materiales donantes (ver Tsirigotis P et al, Immunotherapy 4: 407-24 (2012)). Los primates no humanos se utilizan para determinar los efectos *in vivo* de SLT-1A:: α 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:: α 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:: α CCR5. El uso de SLT-1A:: α CCR5 para bloquear la infección por VIH se prueba administrando una dosis aguda de SLT-1A:: α 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 10. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina Shiga y un dominio de inmunoglobulina anti-Env

En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se deriva de la subunidad A de la toxina Shiga (Stx-A). Una región de unión de tipo inmunoglobulina α Env se deriva de los anticuerpos existentes que se unen a la glicoproteína de la envoltura del VIH (Env), tal como GP41, GP120, GP140 o GP160 (véase, por ejemplo, Chen W et al., J Mol Bio 382: 779-89 (2008); Chen W et al., Expert Opin Biol Ther 13: 657-71 (2013); van den Kerkhof T et al., Retrovirology 10: 102 (2013) o de anticuerpos generados usando técnicas estándar (ver Prabakaran et al., Front Microbiol 3: 277 (2012)). Las Envs son proteínas de la superficie del VIH que también se muestran en las superficies celulares de las células infectadas por el VIH durante la replicación del VIH. Aunque las Envs se expresan en células infectadas predominantemente en compartimentos endosómicos, pueden estar presentes cantidades suficientes de Envs en una superficie celular para ser dirigidas por una proteína citotóxica altamente potente. Además, las proteínas citotóxicas que dirigen Env podrían unirse a los viriones del VIH y entrar en las células recién infectadas durante la fusión de los viriones con una célula huésped.

Debido a que el VIH muestra una alta tasa de mutación, es preferible usar un dominio de inmunoglobulina que se una a una parte funcional limitada de una Env, como lo demuestran los anticuerpos ampliamente neutralizantes que se unen a Env de múltiples cepas de VIH (van den Kerkhof T et al., Retrovirology 10: 102 (2013)). Debido a que se cree que las Env presentes en la superficie de una célula infectada presentan epítomos restringidos estéricamente

(Chen W et al., J Virol 88: 1125-39 (2014)), es preferible usar regiones de unión menores de 100 kD e idealmente más pequeñas que 25 kD, tal como fragmentos de sdAbs como dominios V_H H.

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

La región de unión de tipo inmunoglobulina αEnv y la región efectora de toxina Shiga están unidas para formar una proteína citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce al expresar un polinucleótido que codifica la proteína de unión a Env SLT-1A::αEnv. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A::αEnv se logra utilizando 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::αEnv

Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para células Env⁺ y células Env⁻ se determinan mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores. La B_{max} para SLT-1A::αEnv con respecto a las células positivas Env⁺ se mide en aproximadamente 50.000-200.000 MFI con una K_D dentro del rango de 0.01-100 nM, mientras que no hay una unión significativa a las células Env⁻ en este ensayo.

Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::αEnv se determinan en una traducción de proteínas *in vitro* sin células como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la proteína citotóxica de este ejemplo sobre la síntesis de proteínas libres de células es significativo. La IC₅₀ de SLT-1A::αEnv en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

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

Las características de citotoxicidad de SLT-1A::αEnv se determinan mediante el ensayo general de eliminación celular, tal como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores usando células Env⁺. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A::αEnv se determinan mediante el mismo ensayo general de eliminación celular usando células Env⁻ en comparación con las células Env⁺. La CD₅₀ de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0.01-100 nM para las células Env⁺ dependiendo de la línea celular y/o la cepa del VIH utilizada para infectar las células para hacerlas Env⁺. La CD₅₀ de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxica) para las células que no expresan Env en una superficie celular en comparación con las células que expresan Env en una superficie celular.

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

El uso de SLT-1A::αEnv para inhibir la infección por VIH se prueba administrando SLT-1A::αEnv a primates no humanos infectados con el virus de la inmunodeficiencia simia (SIV) (véase Sellier P et al., PLoS One 5: e10570 (2010)).

Ejemplo 11. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el anticuerpo αUL18

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 αUL18 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::αUL18

La región de unión de tipo inmunoglobulina αUL18 y la región efectora de la toxina Shiga se unen entre sí para formar una proteína, en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina no está situada de forma próxima al extremo amino terminal de la proteína en comparación con la región efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, se produce una proteína de fusión mediante la expresión de un polinucleótido que codifica la proteína de unión a αUL18 SLT-1A::αUL18. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A::αUL18 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::αUL18

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

Bmax para SLT-1A:: α 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.

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

10 Determinación de la citotoxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A:: α UL18 utilizando un ensayo de eliminación celular

15 Las características de citotoxicidad de SLT-1A:: α 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:: α 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 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_{50} 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.

25 **Ejemplo 12. Una proteína citotóxica derivada de la subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 y el antígeno intestinal de ahelminto del anticuerpo**

30 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). Una región de unión del tipo de inmunoglobulina antígeno de ahelminto intestinal se deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, para el helminto ortólogo de un receptor de transferrina humano (véase, por ejemplo, el gen nematodo gcp-2.1 UniProt G8JYE4_CAEEL; Rosa B et al. , Mol Cell Proteomics M114.046227 (2015)).

35 Construcción, producción y purificación de la proteína citotóxica SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal

40 La región de unión del tipo de inmunoglobulina antígeno de ahelminto intestinal y la región efectora de la toxina Shiga se unen para formar una proteína en la que la región de unión del tipo de inmunoglobulina no está ubicada de manera próxima al extremo amino terminal de la proteína en comparación con la región efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce al expresar un polinucleótido que codifica la proteína de unión al antígeno de α Helminto intestinal SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A:: α Leishmania se logra utilizando sistemas de traducción de proteínas libres de células y/o bacterianos como se describe en los ejemplos anteriores.

45 Determinación de las características *in vitro* de la proteína citotóxica SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal

50 Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo se determinan mediante un ensayo de unión molecular conocido en la técnica usando una proteína diana recombinante purificada. La K_D para SLT-SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal para la proteína diana se mide en aproximadamente 100 nM, mientras que no hay una unión significativa a una proteína de control negativo (por ejemplo, receptor de transferrina humana purificada, recombinante) en este ensayo.

55 Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal se determinan en una traducción de proteínas *in vitro* sin células, como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibidor de la proteína citotóxica de este ejemplo sobre la síntesis de proteínas libres de células es significativo. La IC_{50} de SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células es de aproximadamente 0,1-100 pM.

Determinación de la toxicidad de la proteína citotóxica SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal usando helmintos

60 La toxicidad de SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal a los helmintos se determina usando helmintos modelo (véase, por ejemplo latsenko I et al., Toxinas 2050-63 (2014)). Al helminto se puede administrar SLT-1A::antígeno de α Helminto intestinal purificado mediante remojo o, alternativamente, alimentando el helminto con bacterias que expresan la proteína de fusión SLT-1A::antígeno de ahelminto intestinal.

Además, a los animales de laboratorio que albergan helmintos y/o que presentan enfermedades relacionadas con helmintos se les administra SLT-1A::antígeno de α helminto intestinal y se monitorea la reducción o eliminación de helmintos y/o síntomas asociados de helmintos parásitos.

5 **Ejemplo 13. 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 11 y que se une a la biomolécula diana extracelular indicada en la columna 2 de la Tabla 11. Las proteínas citotóxicas de ejemplo de este ejemplo se crean con regiones efectores de la toxina Shiga próximas amino terminales utilizando técnicas conocidas en el sector y opcionalmente se unen con un agente o agentes promotores de la detección. 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, por ejemplo, para diagnosticar y tratar las enfermedades, afecciones o trastornos indicados en la columna 3 de la Tabla 11.

20 **Tabla 11. Varias regiones de unión de tipo inmunoglobulina para el reconocimiento celular de proteínas citotóxicas**

Origen de la región de unión	Diana extracelular	Aplicación o aplicaciones
alemtuzumab	CD52	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
basiliximab	CD25	trastornos de células T, tales como la prevención de rechazos de trasplante de órganos y algunos cánceres del linaje de células B
brentuximab	CD30	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
catumaxomab	EpCAM	varios cánceres, tales como cáncer de ovario, ascitis maligna, cáncer gástrico
cetuximab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorrectal y de cabeza y cuello
daclizumab	CD25	cánceres de linaje de células B y trastornos de células T, tales como el rechazo de trasplante de órganos
daratumumab	CD38	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T
dinutuximab	gangliósido GD2	Varios cánceres, tales como cáncer de mama, cánceres mieloides y neuroblastoma
efalizumab	LFA-1 (CD11a)	trastornos autoinmunes, tales como psoriasis
ertumaxomab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
gemtuzumab	CD33	cáncer 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 α 4	trastornos autoinmunes, tales como esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn
obinutuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ocaratuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ocrelizumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados

		con células B, tales como trastornos autoinmunes
ofatumumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
palivizumab	Proteína F del virus sincitial respiratorio	tratar el virus sincitial respiratorio
panitumumab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y cáncer de cabeza y cuello
pertuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
pro 140	CCR5	infección por VIH y trastornos de células T
ramucirumab	VEGFR2	varios cánceres y trastornos relacionados con cáncer, tales como tumores sólidos
rituximab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
tocilizumab o atlizumab	receptor de IL-6	trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide
tositumomab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
trastuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
ublituximab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
vedolizumab	integrina $\alpha 4\beta 7$	trastornos autoinmunes, tales como la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa
anticuerpos de unión y scFv de CD20	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes (véase, por ejemplo, Geng S et al. Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006); Olafsen T et al. Protein Eng Des Sel 23: 243-9 (2010))
scFv de unión a CD22	CD22	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B (véase, por ejemplo, Kawas S et al. MAbs s: 479-86 (2011))
scFv de unión a CD25	CD25	varios cánceres de linaje de células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T (véase, por ejemplo, Muramatsu H et al., Cancer Lett 225: 225-36 (2005))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD30	CD30	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B/células T (véase, por ejemplo, Klimka A et al., Br J Cancer 83: 252-60 (2000))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD33	CD33	cáncer mielóide o trastorno inmunitario (véase, por ejemplo, Benedict C et al., J Immunol Methods 201: 223-31 (1997))
dominios de inmunoglobulina de unión a CD38	CD38	cánceres hematológicos, trastornos inmunitarios relacionados con células B y trastornos inmunitarios relacionados con células T (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos 8,153,765)
scFv de unión a CD40	CD40	varios cánceres y trastornos inmunitarios (véase, por ejemplo, Ellmark P et al., Immunology 106: 456-63 (2002))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD52	CD52	Cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos 7,910,104 B2)
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD56	CD56	trastornos inmunitarios y varios cánceres, tales como cáncer de pulmón, Merkel cell carcinoma,

		mieloma (véase, por ejemplo, Shin J et al., <i>Hybridoma</i> 18: 521-7 (1999))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD79	CD79	cánceres de células B o trastornos inmunitarios relacionados con células B (véase, por ejemplo, Zhang L et al. <i>Ther. Immunol.</i> 2: 191-202 (1995))
anticuerpos monoclonales de unión y scFv de unión a CD133	CD133	varios cánceres, tumores hematológicos y trastornos inmunitarios (véase, por ejemplo, Bidlingmaier S et al., <i>J Mol Med</i> 86: 1025-32 (2008); Pavlon L et al., <i>J Microsc</i> 231: 374-83 (2008); Rappa G et al., <i>Stem Cells</i> 26: 3008-17 (2008); Swaminathan S et al., <i>J Immunol Methods</i> 361: 110-5 (2010); Wang J et al., <i>Hybridoma</i> 29: 241-9 (2010); Zhu X et al., <i>Mol Cancer Ther</i> 9: 2131-41 (2010); Xia J et al., <i>Sci Rep</i> 3: 3320 (2013))
scFv de unión a CD248	CD248	varios cánceres, tales como angiogénesis inhibitora (véase, por ejemplo, Zhao A et al., <i>J Immunol Methods</i> 363: 221-32 (2011))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a EpCAM	EpCAM	varios cánceres, tales como cáncer de ovario, ascitos malignos, cáncer gástrico (véase, por ejemplo, Schanzer J et al., <i>J Immunother</i> 29: 477-88 (2006))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a PSMA	PSMA	cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Frigerio B et al., <i>Eur J Cancer</i> 49: 2223-32 (2013))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a Eph-B2	Eph-B2	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Abéngozar M et al., <i>Blood</i> 119: 4565-76 (2012))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a endoglina	Endoglina	varios cánceres, tales como cáncer de mama y cánceres colorectales (véase, por ejemplo, Völkel T et al., <i>Biochim Biophys Res Acta</i> 1663: 158-66 (2004))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a FAP	FAP	varios cánceres, tales como sarcomas y cánceres de hueso (véase, por ejemplo, Zhang J et al., <i>FASEB J</i> 27: 581-9 (2013))
anticuerpo o anticuerpos y scFv de unión a CEA	CEA	varios cánceres, tales como cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón y cáncer de mama (véase, por ejemplo, Neumaier M et al., <i>Cancer Res</i> 50: 2128-34 (1990); Pavoni E et al., <i>BMC Cancer</i> 6: 4 (2006); Yazaki P et al., <i>Nucl Med Biol</i> 35: 151-8 (2008); Zhao J et al., <i>Oncol Res</i> 17: 217-22 (2008))
anticuerpo o anticuerpos monoclonales de unión a CD24	CD24	varios cánceres, tales como bladder cancer (véase, por ejemplo, Kristiansen G et al., <i>Lab Invest</i> 90: 1102-16 (2010))
scFv de unión a antígenos de Lewis Y	antígenos de Lewis Y	varios cánceres, tales como cáncer de cuello de útero y cáncer uterino (véase, por ejemplo, Power B et al., <i>Protein Sci</i> 12: 734-47 (2003); monoclonal antibody BR96 Feridani A et al., <i>Cytometry</i> 71: 361-70 (2007))
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígeno de la superficie de la gripe (por ejemplo, hemaglutininas y proteína de matriz 2)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., <i>Front Microbiol</i> 3: 277 (2012))
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígenos de la superficie de coronavirus	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., <i>Front Microbiol</i> 3: 277 (2012))
Varios anticuerpos	Antígenos de la superficie de filovirus (por ejemplo VP35, VP40 y glicoproteína)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Olinger G et al., <i>Proc Natl Acad Sci U.S.A.</i> 109: 18030-5 (2012); Pettitt J et al., <i>Sci Transl Med</i> 5: 199ra113 (2013); Stahelin R, <i>Expert Opin Ther Targets</i> 18: 115-20 (2014); Becquart P et al., <i>PLoS One</i> 9: e96360 (2014); Stahelin R, <i>Front Microbiol</i> 5: 300 (2014); Tran E et al., <i>J Virol</i> 88: 10958-62 (2014);

		Murin C et al., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 111: 17182-7 (2014))
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígenos de la superficie de henipavirus	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012))
Varios anticuerpos que incluyen anticuerpos ampliamente neutralizantes y scFv	Antígenos de la superficie de VIH (por ejemplo, proteína de matriz Map 17)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Kitidee K et al., BMC Biotechnol 10: 80 (2010); Yu L, Guan Y, Front Immunol 5: 250 (2014))
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígenos de la superficie de gripe (por ejemplo, hemaglutininas y proteína de matriz 2)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., Front Microbiol 3: 277 (2012))

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 ALRFRQIQRGFRTTLDDL SGRSYV MTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYH GQDSVRVGRISFGSINAILGSVALI LNCHHHASRVARMASDEFPSMCP ADGRVRGITHNKILWDSSTLGAIL MRRTISS
SEQ ID NO: 2	Subunidad A de la toxina Shiga (StxA)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAI GTPLQTISSGGTSLLMIDSGTGDN LFAVDVRGIDPEEGRFNRLRIVE RNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADF SHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLM SHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTA EALRFRQIQRGFRTTLDDL SGRSY 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 TPLGNISQGGVSVSVINHVVLGGNY ISLNVRGLDPYSERFNHLRLIMER NNLVYVAGFINTETNIFYRFSDFSHI SVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIADL ERTGMQIGRHSLVGSYLDLMEFR GRSMTRASSRAMLRFTVIAEAL RFRQIQRGFRPALSEASPLYTMTA QDVDLTLNWGRISNVLPEYRGEE GVRIGRISFNLSAILGSVAVILNC HSTGYSVRSVSQKQKTECQIVGD RAAIKVNNVLWEANTIAALLNRK PQDLTEPNQ</p>
<p>SEQ ID NO: 4</p>	<p>SLT-1A::αCD38scFv variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFVAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVYF RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFROIQRGFRRT LDDLSGRSYVMTEADVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIET QSPSSFSVSLGDRVTITCKASEDI YNRLAWYQQKPGNAPRLLISGA TSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSE TSLQTEDVATYYCQQYWSTPTF GGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG SKVQLQESGPSLVQPSQRLSITC TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWRGGSTDYNAAFMS RLSITKDNSKSQVFFKMNSLQA DDTAIYFCAKTLITTGYAMDYW GQGTTVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 5</p>	<p>SLT-1A::αCD38scFv variante 2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLDIELTQSPSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRLAWYQQKPGN APRLLISGATSLETGVPSRFSGSG SGKDYTLSITSLQTEDVATYYCQ QYWSTPTFGGGTKLEIKGSTSGS GKPGSGEGSKVQLQESGPSLVQ PSQRLSITCTVSGFSLISYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTD YNAAFMSRLSITKDNSKSQVFF KMNSLQADDTAIYFCAKTLITT GYAMDYWGQGTTVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 6</p>	<p>SLT-1A::αCD38scFv variante 3</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIELT</p>

		<p>QSPSSFSVSLGDRVTITCKASEDI YNRLAWYQQKPGNAPRLLISGA TSLETGVPSRFSGSGSGKDYTL TSLQTEDVATYYCQQYWSTPTF GGGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEG SKVQLQESGPSLVQPSQRLSITC TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKG LEWLGVIWRGGSTDYNAAFMS RLSITKDNSKSQVFFKMNSLQA DDTAIYFCAKTLITTYAMDYW GQGTTVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 7</p>	<p>SLT-1A::αCD38scFv variante 4</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFVAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVYF RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHS TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGR SFGSINAILGSVALILNSHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLDIELTQSPSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRLAWYQQKPGN APRLLISGATSLETGVPSRFSGSG SGKDYTLTSLQTEDVATYYCQ QYWSTPTFGGGTKLEIKGSTSGS GKPGSGEGSKVQLQESGPSLVQ PSQRLSITCTVSGFSLISYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTD YNAAFMSRLSITKDNSKSQVFF KMNSLQADDTAIYFCAKTLIT TYAMDYWGQGTTVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 8</p>	<p>SLT-1A::αHER2scFv variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRGTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAELRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMATAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIQM TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGK PGSGEGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDVWGQGTLVTVSS</p>
---------------------	---	--

<p>SEQ ID NO: 9</p>	<p>SLT-1A::αHER2scFv variante 2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDL SGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDVWGQGT LVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 10</p>	<p>SLT-1A::αHER2scFv variante 3</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDL SGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIQM TQSPSSLSASVGDRV TITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF TLTISSLQPEDFATYYCQQHYTT PPTFGQGTKVEIKRTGSTSGSGK PGSGEGSEVQLVESGGGLVQPG GSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVR</p>

		<p>QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCSRWGGDG FYAMDVWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 11</p>	<p>SLT-1A::αHER2scFv variante 4</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFADVVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAELRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKP GKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR TGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVAR IYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRWGGDGFYAMDVWGQGT LTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 12</p>	<p>SLT-1A::αCD19scFv variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIVM TQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKS LLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPQ LLIYRMSNLAGVPPDRFSGSGSG TAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ HLEYPFTFGAGTKLELKGSTSGS GKPGSGEGSEVQLQQSGPELIKp GASVKMSCKASGYTFTSYVMH WVKQKPGQGLEWIGYINPYND GTKYNEKFKGKATLTSDKSSST AYMELSSLTSEDSAVYYCARGT YYYGSRVFDYWGQGTTLTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 13</p>	<p>SLT-1A::αCD19scFv variante 2</p>	

		<p> MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLDIVMTQAAPSIPVTPGESV SISCRSSKSLNNSNGNTYLYWFL QRPQSPQLLIYRMSNLAGVP DRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED VGVYYCMQHLEYPFTFGAGTK LELKGSTSGSGKPGSGEGSEVQL QQSGPELIKPGASVKMSCKASG YTFTSYVMHWVKQKPGQGLEW IGYINPYNDGTKYNEKFKGKAT LTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSA VYYCARGTYYYGSRVFDYWGQ GTTLTVSS </p>
--	--	---

<p>SEQ ID NO: 14</p>	<p>SLT-1A::αCD19scFv variante 3</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVYF RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSSGRSYVMTAEDVDLTN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIVM TQAAPSIPVTPGESVSISCRSSKS LLNSNGNTYLYWFLQRPQGSPQ LLIYRMSNLAGVDPDRFSGSGSG TAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQ HLEYPFTFGAGTKLELKGSTSGS GKPGSGEGSEVQLQQSGPELIK GASVKMSCKASGYTFTSYVMH WVKQKPGQGLEWIGYINPYND GTKYNEKFKGKATLTSDKSSST AYMELSSLTSEDSAVYYCARGT YYYGSRVFDYWGQGTTTLTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 15</p>	<p>SLT-1A::αCD19scFv variante 4</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG</p>

		<p>DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVYF RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLDIVMTQAAPSIPVTPGESV SISCRSSKSLNSNGNTYLYWFL QRPQSPQLLIYRMSNLAGSVP DRFSGSGSGTAFTLRISRVEAED VGVYYCMQHLEYPFTFGAGTK LELKGSTSGSGKPGSGEGSEVQL QQSGPELIKPGASVKMSCKASG YTFTSYVMHWVKQKPGQGLEW IGYINPYNDGTYNEKFKGKAT LTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSA VYYCARGTYYYGSRVFDYWGQ GTTLTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 16</p>	<p>SLT-1A::αCD74scFv variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVYF RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIQL TQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQS LVHRNGNTYLHWFQQRPQSP RLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQ SSHVPPTFGAGTRLEIKGSTSGS GKPGSGEGSTKGQVQLQQSGSE LKKPGASVKVSCKASGYTFTNY GVNWIQAPGQGLQWMGWINP NTGEPTFDDDFKGRFAFSLDTSV STAYLQISSLKADDTAVYFCSRS RGKNEAWFAYWGQGLTVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 17</p>	<p>SLT-1A::αCD74scFv variante 2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLDIQLTQSPLSLPVTLGQPAS ISCRSSQSLVHRNGNTYLHWFQ QRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEI KGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQ LQQSGSELKKPGASVKVSCCAS GYTFTNYGVNWIKQAPGQGLQ WMGWINPNTGEPTFDDDFKGRF AFSLDTSVSTAYLQISSLKADDT AVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQ GTLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 18</p>	<p>SLT-1A::αCD74scFv variante 3</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPDIQL TQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQS LVHRNGNTYLHWFQQRPGQSP RLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEADVGVYFCSQ SSHVPPTFGAGTRLEIKGSTSGS GKPGSGEGSTKGQVQLQQSGSE LKKPGASVKVSCCASGYTFTNY GVNWIKQAPGQGLQWMGWINP NTGEPTFDDDFKGRFAFSLDTSV STAYLQISSLKADDTAVYFCSRS RGKNEAWFAYWGQGLVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 19</p>	<p>SLT-1A::αCD74scFv variante 4</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLDIQLTQSPLSLPVTLGQPAS ISCRSSQSLVHRNGNTYLHWFQ QRPGQSPRLLIYTVSNRFSGVPD RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYFCSQSSHVPPTFGAGTRLEI KGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQ LQQSGSELKKPGASVKVSCKAS GYTFTNYGVNWIKQAPGQGLQ WMGWINPNTGEPTFDDDFKGRF AFSLDTSVSTAYLQISSLKADDT AVYFCSRSRGKNEAWFAYWGQ GTLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 20</p>	<p>SLT-1A::αHER2-V_HH variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VARAHHSEDPSSKAPKAPEVQL VESGGGLVQAGGSLRLSCAASG ITFSINTMGWYRQAPGKQRELV ALISSIGDTYYADSVKGRFTISR NAKNTVYLMNSLKPEDTAVY YCKRFRTAAQGTDYWGQGTQV TVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 21</p>	<p>SLT-1A::αHER2-V_HH variante 2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPEVQL VESGGGLVQAGGSLRLSCAASG ITFSINTMGWYRQAPGKQRELV ALISSIGDTYYADSVKGRFTISR D NAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCKRFRATAAQGTDYWGQGTQV TVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 22</p>	<p>SLT-1A::αHER2-V_HH variante 3</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VARAHSEDPSSKAPKAPGILGF VFTLEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGITFSINTMGWYRQAP GKQRELVALISSIGDTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCKRFRATAAQGTDY WGQGTQVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 23</p>	<p>SLT-1A::αHER2-V_HH variante 4</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDL SGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGITFSINTMGWYRQAP GKQRELVALISSIGDTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYLQMNSLK PEDTAVYYCKRFRRTAAQGTDY WGQGTQVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 24</p>	<p>StxA::αHER2-V_HH variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDL SGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VARAHHSEDPSSKAPKAPEVQL VESGGGLVQAGGSLRLSCAASG ITFSINTMGWYRQAPGKQRELV ALISSIGDTYYADSVKGRFTISR NAKNTVYLQMNSLKPEDTAVY YCKRFRRTAAQGTDYWGQGTQV TVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 25</p>	<p>StxA::α.HER2-V_HH variante 2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPEVQL VESGGGLVQAGGSLRLSCAASG ITFSINTMGWYRQAPGKQRELV ALISSIGDTYYADSVKGRFTISR NAKNTVYLMNSLKPEDTAVY YCKRFRTAAQGTDYWGQGTQV TVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 26</p>	<p>StxA::α.HER2-V_HH variante 3</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLN WGRSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VARAHHSEDPSSKAPKAPGILGF VFTLEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGITFSINTMGWYRQAP GKQRELVALISSIGDTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYLMNSLKP EDTAVYYCKRFRTAAQGTDY WGQGTQVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 27</p>	<p>StxA::α.HER2-V_HH variante 4</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT</p> <p>LDDLSSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRSSVLPDYHGQDSVRVGRV SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLEVQLVESGGGLVQAGGSL RLSCAASGITFSINTMGWYRQAP GKQRELVALISSIGDTYYADSVK GRFTISRDNKNTVYLMNSLK PEDTAVYYCKRFRRTAAQGTDY WGOGTOVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 28</p>	<p>SLT-1A::α.CD20-FN3 variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT</p> <p>LDDLSSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRSSVLPDYHGQDSVRVGRV SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPASVS DVPRDLEVVAATPTSLLISWCR QRCADSYRITYGETGGNSPVQE FTVPGSWKTATISGLKPGVDYTI TVYVVTHYYGWDRYSHPI SINY RTGS</p>

<p>SEQ ID NO: 29</p>	<p>SLT-1A::αCD20-FN3 variante 2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTN WGRLESSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLASVSDVPRDLEVVAATPTS LLISWCRQRCADSYRITYGETGC NSPVQEFTVPGSWKTATISGLKP GVDYTITVYVVTHYYGWDRYS HPISINYRTGS</p>
<p>SEQ ID NO: 30</p>	<p>StxA::αCD20-FN3 variante 1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVFY RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLSGRSYVMTAEDVDLTN WGRLESSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNSHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPASVS DVPRDLEVVAATPTSLLISWCR QRCADSYRITYGETGGNSPVQE FTVPGSWKTATISGLKPGVDYTI TVYVVTHYYGWDRYSH PISINY RTGS</p>

SEQ ID NO: 31	StxA:: α CD20-FN3 variante 2	MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRS AIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGTG DNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLR LIVERNNLYVTGFVNRTNNVfy RFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSS YTTLQRVAGISRTGMQINRHSLT TSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMATAEDVDLTN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRI SFGSINAILGSVALILNCHHHASR VAREFPKPSTPPGSSGGAPGILGF VFTLASVSDVPRDLEVVAATPTS LLISWCRQRCADSYRITYGETGG NSPVQEFTVPGSWKTATISGLKP GVDYTITVYVVTHYYGWDRYS HPISINYRTGS
---------------	--	---

REIVINDICACIONES

1. Proteína citotóxica que comprende:
- 5 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, en la que dicha región de unión de tipo inmunoglobulina se deriva de un anticuerpo, en la que dicha biomolécula diana extracelular es HER2/neu/ErbB2; y
- b) una región efectora de la toxina Shiga que comprende un polipéptido que es capaz de efectuar la citotoxicidad de la Subunidad A de la toxina Shiga, y comprende:
- 10 una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de 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 la 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
- 15 (iv) aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3,
- en la que la proteína es capaz de causar la muerte de una célula físicamente acoplada con dicho HER2/neu/ErbB2; y
- en la que la región de unión y la región efectora de la toxina Shiga están orientadas dentro de la proteína de manera que la región de unión se encuentra en una posición que está más próxima al extremo carboxi terminal de la región efectora de la toxina Shiga que al extremo amino terminal de la región efectora de la toxina Shiga.
- 20
2. Proteína citotóxica de la reivindicación 1, en la que la proteína exhibe un efecto citotóxico que es al menos 3 veces mayor a una primera población de células cuyos miembros están físicamente acoplados con dicho HER2/neu/ErbB2, en comparación con una segunda población de células cuyos miembros no están físicamente
- 25 acoplados con dicho HER2/neu/ErbB2.
3. Proteína citotóxica de la reivindicación 2, en la que dicha primera población de células está físicamente acoplada con dicho HER2/neu/ErbB2 mediante interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan dicho HER2/neu/ErbB2, o una porción del mismo, al exterior de una célula; o en la que dicho HER2/neu/ErbB2 es una
- 30 proteína de membrana integral o proteína de membrana periférica expresada por la primera población de células.
4. Proteína citotóxica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la región efectora de la toxina Shiga comprende:
- (i) aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, o SEQ ID No: 3;
- 35 (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; o
- (iv) aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
5. Proteína citotóxica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la región efectora de la toxina Shiga 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 de la región efectora de la toxina Shiga, la mutación seleccionada de al menos una eliminación, inserción o sustitución de residuo de aminoácido; en la que la subunidad A de origen natural de un
- 40 miembro de la familia de toxinas Shiga comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID No: 1-3.
- 45
6. Proteína citotóxica de la reivindicación 5, en la que la mutación reduce la citotoxicidad de la región efectora de la toxina Shiga.
7. Proteína citotóxica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la región de unión de tipo
- 50 inmunoglobulina comprende un fragmento variable de cadena única (scFv).
8. Proteína citotóxica de la reivindicación 7, en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende los aminoácidos 269-512 de la SEQ ID No: 8.
9. Proteína citotóxica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la región de unión de tipo
- 55 inmunoglobulina comprende un fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb).
10. Proteína citotóxica de la reivindicación 9, en la que el fragmento de anticuerpo de dominio único es un fragmento V_HH.
- 60
11. Proteína citotóxica de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en forma de un homomultímero o heteromultímero.
12. Proteína citotóxica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en forma de una sal o solvato
- 65 farmacéuticamente aceptable.

13. Composición farmacéutica que comprende una proteína citotóxica, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 14. Composición farmacéutica de la reivindicación 13, en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un disolvente o medio de dispersión fisiológicamente aceptable; y/o en la que el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende agua, alcohol, un poliol y mezclas adecuadas de los mismos; un aceite vegetal; o un éster orgánico inyectable.
- 10 15. Composición farmacéutica de la reivindicación 13 o 14, que comprende además un adyuvante; un recubrimiento; un agente antimicrobiano, antibacteriano o antifúngico; un agente isotónico; un polialcohol; un agente retardador de la absorción; un estabilizador; un tampón; un tensioactivo; y/o un antioxidante farmacéuticamente aceptable.
- 15 16. Composición farmacéutica de la reivindicación 15, en la que:
 el adyuvante es un conservante, agente humectante, agente emulsionante o agente dispersante;
 el recubrimiento es lecitina;
 el agente antibacteriano o antifúngico es un parabeno, clorobutanol, fenol o ácido sórbico;
 el agente isotónico es un azúcar o cloruro de sodio;
- 20 el polialcohol es manitol o sorbitol; y/o
 el antioxidante farmacéuticamente aceptable es un antioxidante soluble en agua, un antioxidante soluble en aceite o un agente quelante de metales.
- 25 17. Composición farmacéutica de la reivindicación 16, en la que:
 el antioxidante soluble en agua es ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio o sulfito de sodio;
 el antioxidante soluble en aceite es palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, lecitina, propilgalato o alfa-tocoferol; y/o
 el agente quelante de metales es ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético, sorbitol, ácido tartárico o ácido fosfórico.
- 30 18. Polinucleótido que codifica una proteína citotóxica, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o un complemento de la misma.
- 35 19. Vector de expresión que comprende un polinucleótido según la reivindicación 18.
20. Célula huésped que comprende un polinucleótido, según la reivindicación 18, o un vector de expresión, según la reivindicación 19.
- 40 21. Procedimiento *in vitro* para destruir una célula que expresa HER2/neu/ErbB2, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con una proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las reivindicaciones 13-17.
- 45 22. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o una composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 13-17, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que lo necesite, en la que la enfermedad, trastorno o afección se **caracteriza por** células que expresan HER2/neu/ErbB2.
- 50 23. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, para usar, según la reivindicación 22, en la que la enfermedad, trastorno o afección es cáncer o un tumor **caracterizado por** células que expresan HER2/neu/ErbB2.
- 55 24. Proteína citotóxica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o una composición farmacéutica, según una cualquiera de las reivindicaciones 13-17, para usar, según la reivindicación 23, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de mama, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón-tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer uterino.

Figura 1. Dibujo esquemático de la disposición general amino terminal a-carboxi terminal de una proteína de ejemplo de la invención

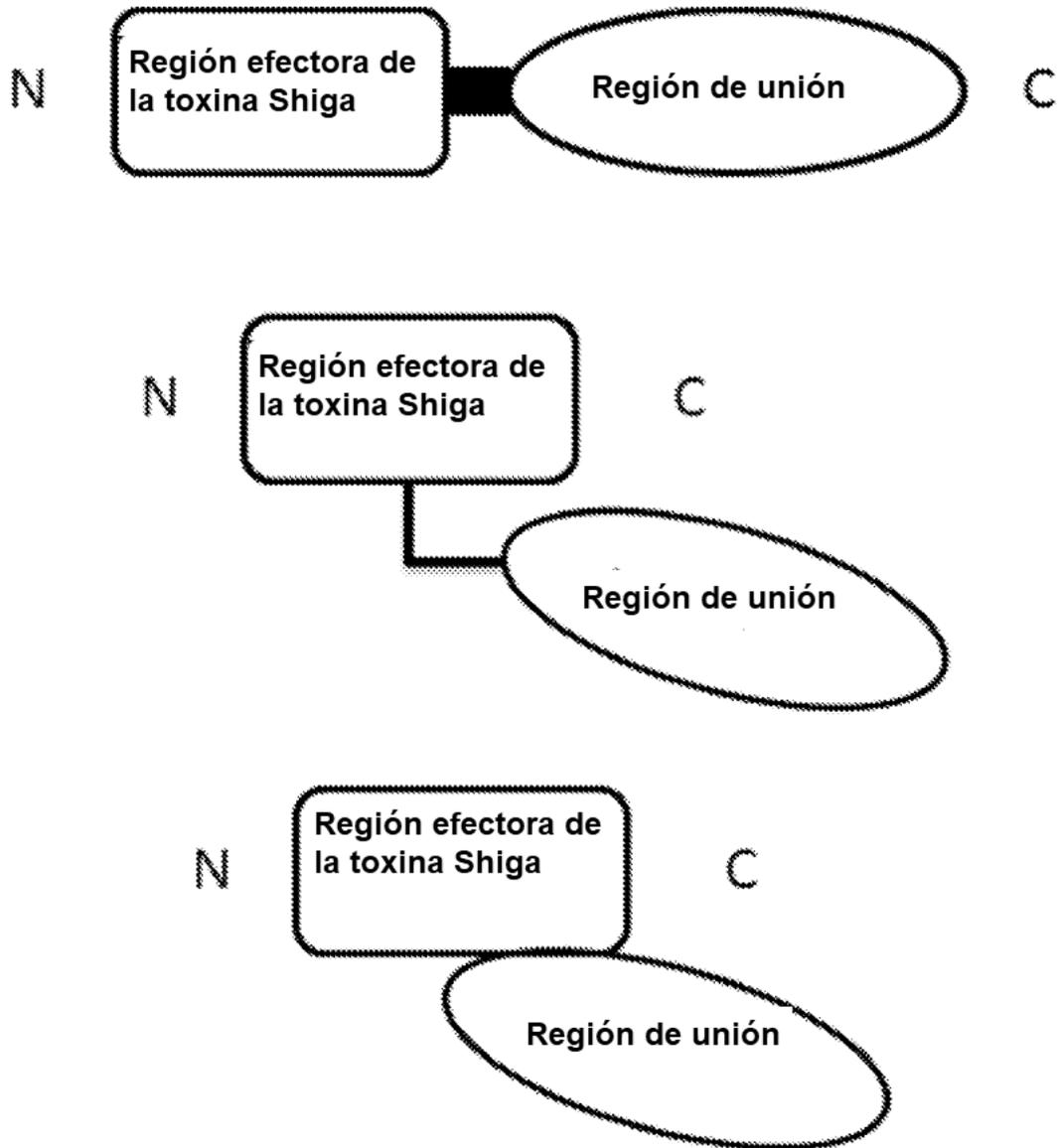


Figura 2. Citotoxicidad dirigida: SLT-1A::alfaCD38scFv mostró una citotoxicidad mejorada a un tipo de célula diana en comparación con la orientación inversa alfaCD38scFv::SLT-1A

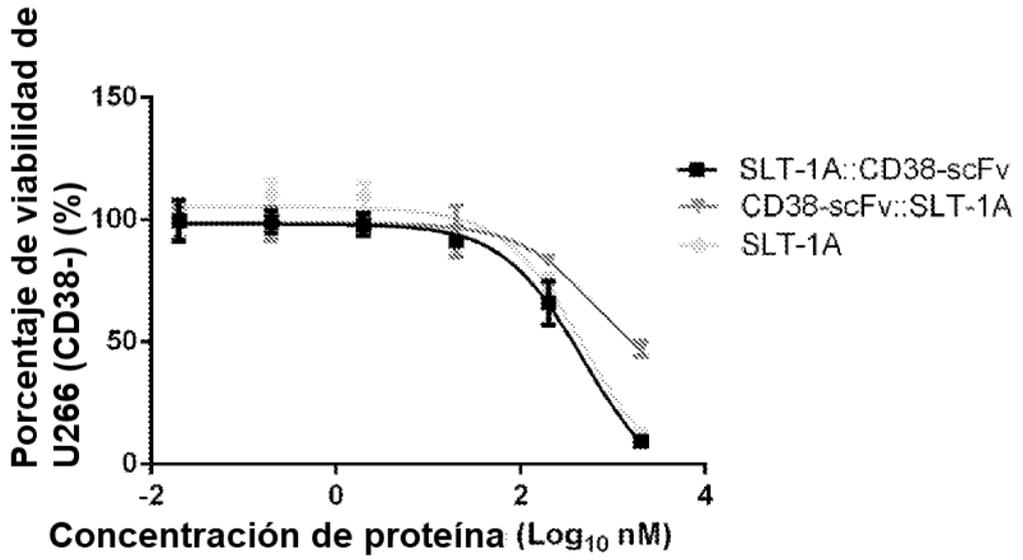
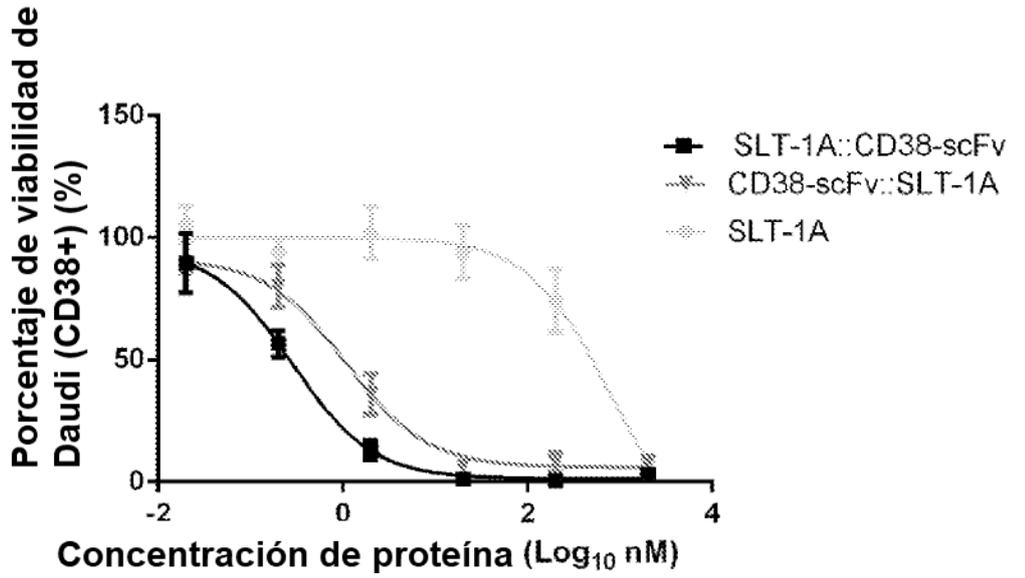


Figura 3. Citotoxicidad dirigida: SLT-1A::alfaHER2scFv mostró una citotoxicidad mejorada a un tipo de célula diana en comparación con la orientación inversa alfaHER2scFv::SLT-1A

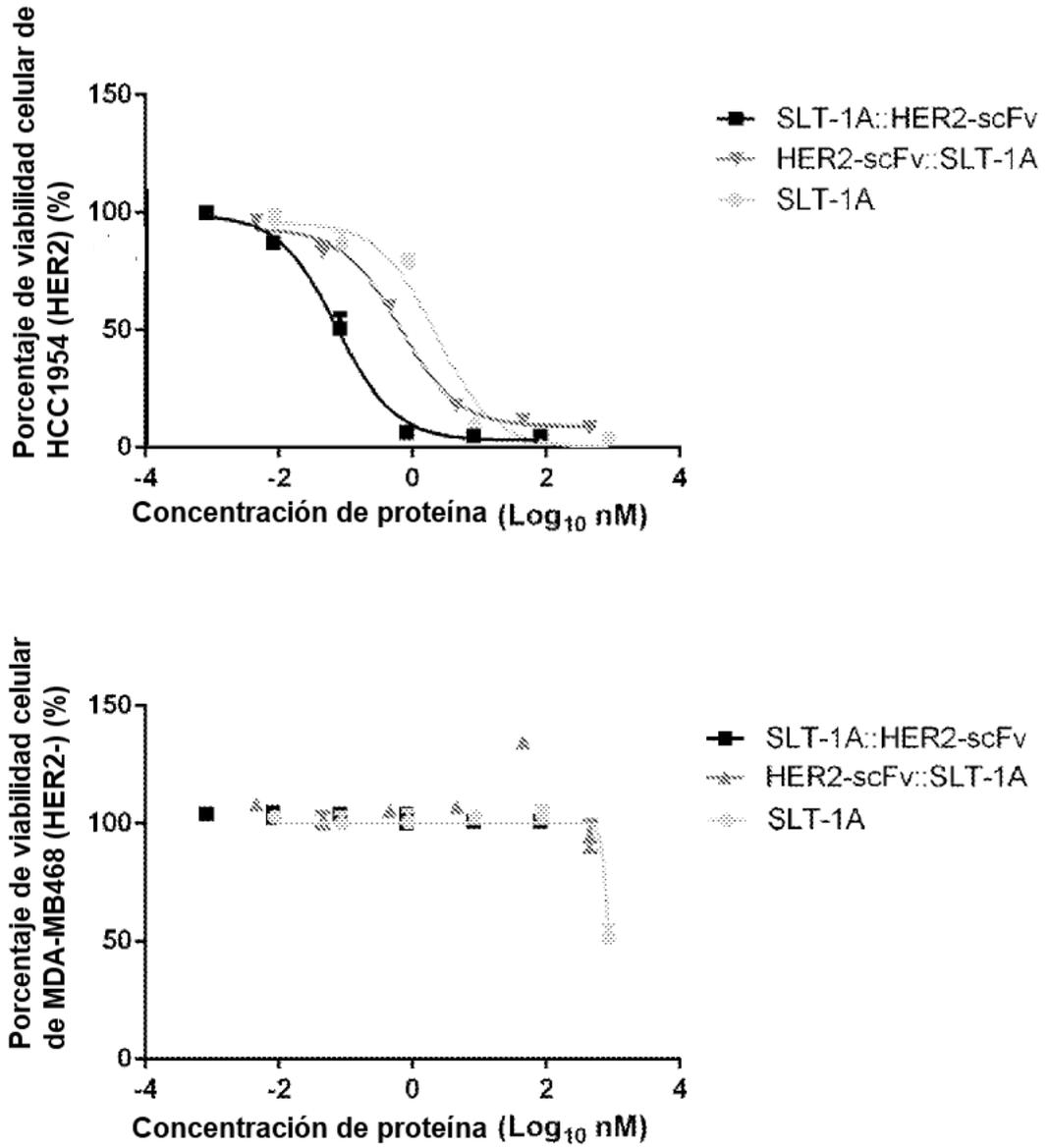


Figura 4: Entrada en célula: Internalización celular similar de alfaHER2scFv::SLT-1A y la orientación inversa SLT-1A::alfaHER2scFv

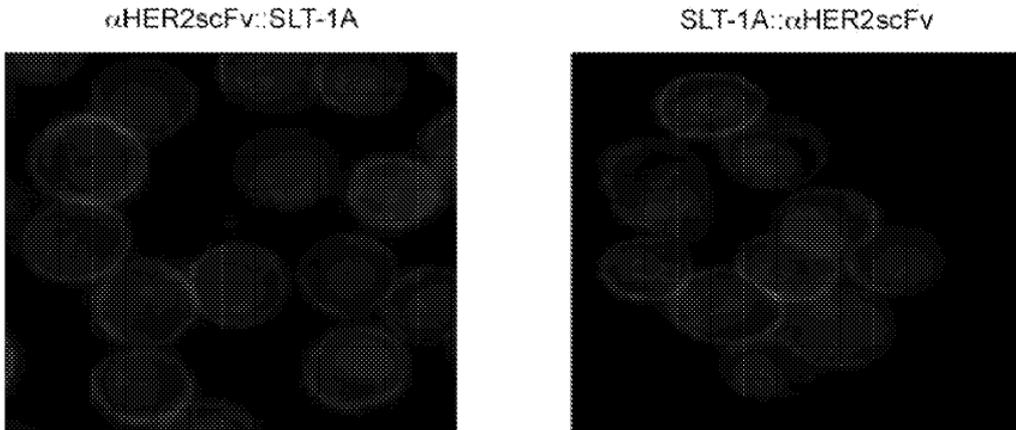


Figura 5. Citotoxicidad dirigida: SLT-1A::alfaCD19scFV mostró una mejor citotoxicidad a un tipo de célula diana en comparación con la orientación inversa alfaCD19scFv::SLT-1A

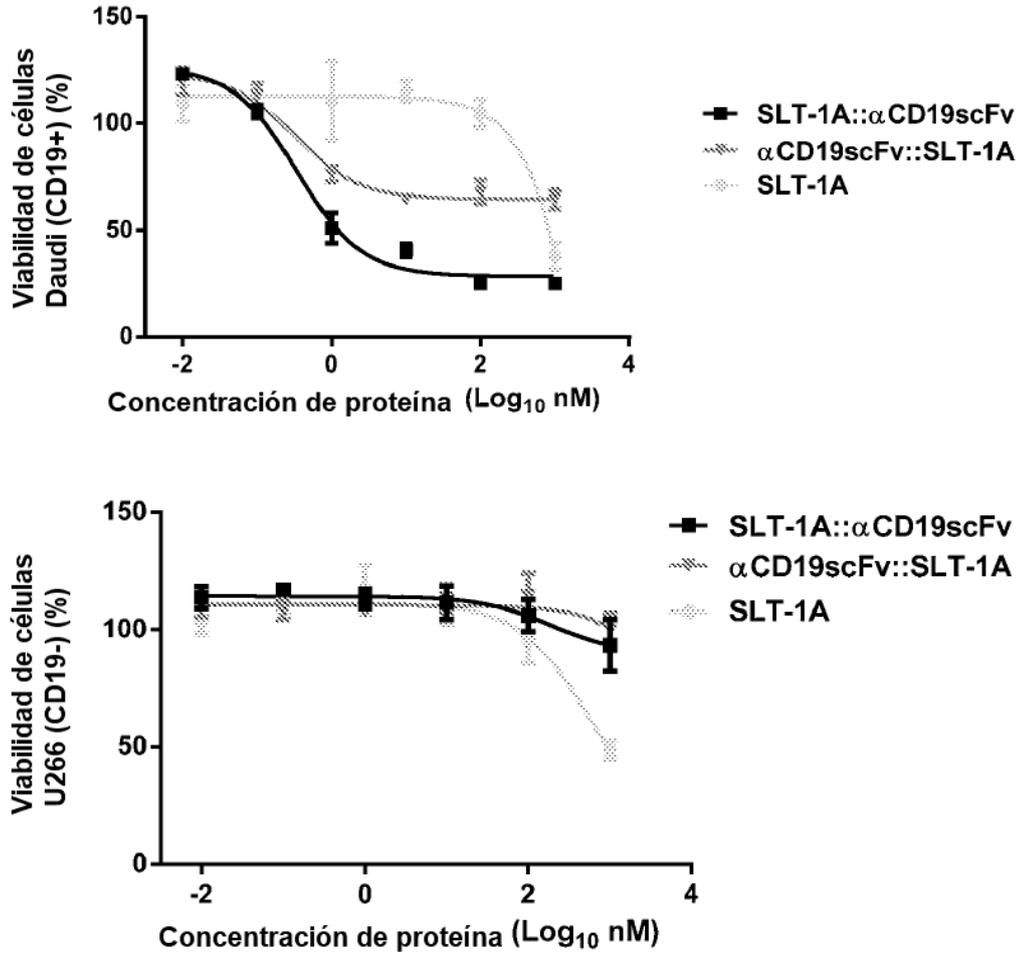


Figura 6. Citotoxicidad dirigida: SLT-1A::alfaCD74scFv mostró una mejor citotoxicidad a un tipo de célula diana en comparación con la orientación inversa alfaCD74scFv::SLT-1A

