

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 847 373**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/25** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2016 PCT/US2016/034778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16196344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2016 E 16729701 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3303373**

54 Título: **Estructuras de subunidad A de toxina Shiga desinmunizadas y molécula de reconocimiento celular que las comprenden**

30 Prioridad:

**30.05.2015 US 201562168758 P  
30.05.2015 US 201562168759 P  
30.05.2015 US 201562168760 P  
30.05.2015 US 201562168761 P  
30.05.2015 US 201562168762 P  
30.05.2015 US 201562168763 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.08.2021**

73 Titular/es:

**MOLECULAR TEMPLATES, INC. (100.0%)  
9301 Amberglen Boulevard, Suite 100  
Austin, TX 78729, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**PONTI & PARTNERS, S.L.P.**

**ES 2 847 373 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

Estructuras de subunidad A de toxina Shiga desinmunizadas y molécula de reconocimiento celular que las comprenden

5

## CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos efectores de toxina Shiga, derivados de las subunidades A de toxinas Shiga naturales, que comprenden una combinación de mutaciones que proporcionan (1) desinmunización, (2) una reducción en la sensibilidad a la proteasa, y/o (3) un epítipo o epítopos de células T integrados; en donde los polipéptidos efectores de toxina Shiga retienen una o más funciones de toxina Shiga, tales como, por ejemplo, potente citotoxicidad. En ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención (1) exhiben un potencial inmunogénico reducido en mamíferos y/o (2) son capaces de suministrar un epítipo de células T CD8+ al sistema de MHC de clase I de una célula en la que el polipéptido está presente.

15

[0002] La presente invención también se refiere a moléculas de reconocimiento celular que comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención tienen usos como estructuras o componentes de moléculas de reconocimiento celular, tales como, por ejemplo, inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina, para matar células y/o suministro subcelular de cargas a ciertos compartimentos subcelulares, tales como, por ejemplo, el suministro de un epítipo de células T integrado al citosol. En general, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son útiles para la administración a organismos multicelulares, como, por ejemplo, cuando es deseable (1) eliminar o reducir toxicidades no específicas, (2) eliminar o reducir ciertas respuestas inmunes, y/o (3) dirigir una respuesta o respuestas inmunes beneficiosas a un epítipo específico suministrado a un tipo de célula específico, tal como, por ejemplo, el reclutamiento de células T CD8+. Las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son útiles (1) para matar selectivamente tipos específicos de células entre otras células y (2) como moléculas terapéuticas para tratar una variedad de enfermedades, trastornos y afecciones, incluidos cánceres, tumores, otras anomalías de crecimiento, trastornos inmunes e infecciones microbianas.

20

25

30

## ANTECEDENTES

[0003] El concepto de "bala mágica" es que se pueden descubrir agentes terapéuticos que atacan específicamente solo a las células enfermas o patógenos dentro de un paciente humano, dejando al paciente ileso. Las inmunotoxinas, híbridos ligando-toxina, inmuno-ARNasas, y otros fármacos molecularmente dirigidos son descendientes del concepto "bala mágica" del Dr. Paul Ehrlich de principios del siglo XX (Strebhardt K, A Ullrich, Nat Rev Cancer 8: 473-80 (2008)). La toxina producida por *S. dysenteriae* se denominó "toxina Shiga" en honor al Dr. Kiyoshi Shiga, asociado del Dr. Ehrlich, por su descubrimiento de esta bacteria en 1897. Recientemente, las toxinas Shiga han sido apreciadas por tener características únicas favorables para su uso en moléculas de internalización celular para terapias dirigidas (ver, por ejemplo, US20150259428). Las toxinas Shiga se pueden combinar con dominios de inmunoglobulina, ligandos y otros restos de reconocimiento para crear agentes terapéuticos dirigidos a células (por ejemplo, inmunotoxinas y fusiones de ligando-toxina) que son "balas mágicas".

35

40

[0004] Las toxinas Shiga pueden tener propiedades ventajosas para su uso en agentes terapéuticos, tales como, por ejemplo, un mecanismo de toxina potente eficaz hacia las células eucariotas, la capacidad para conducir la internalización celular, y capacidad para dirigir el enrutamiento subcelular. Las toxinas Shiga se han diseñado sintéticamente para aplicaciones médicas mediante alteraciones racionales en la estructura, características y actividades biológicas de la toxina (véase, por ejemplo, WO 1999/040185, WO 2005/092917, EP1051482, DE69835695, WO 2007/033497, US2009/0156417, JP4339511, US7713915, EP1727827, DE602004027168, EP1945660, JP4934761, EP2228383, US2013/0196928, WO 2014/164680, WO 2014/164693, US20150259428, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/11300, WO 2015/113005, WO 2015/113005 y WO 2015/191764). Las subunidades A de la toxina Shiga son estables, enzimáticamente activas y citotóxicas, incluso si están truncadas o fusionadas a otros dominios de proteínas.

45

50

[0005] Las principales limitaciones a las aplicaciones terapéuticas que implican moléculas diseñadas sintéticamente derivadas de toxinas bacterianas incluyen respuestas inmunogénicas perjudiciales en los receptores y toxicidades no específicas causadas por componentes tóxicos. La inmunogenidad no deseada de un producto terapéutico podría tener consecuencias desfavorables, tales como una reducción de la eficacia, la producción de anticuerpos neutralizantes, farmacocinética alterada, reacciones generales de inmunidad e hipersensibilidad, anafilaxia, reacciones anafilactoides y limitaciones en el número de dosis repetidas que un receptor puede recibir con seguridad. La reducción de la toxicidad no específica de una molécula terapéutica puede mejorar sus características de seguridad cuando se administra a un receptor, así como alterar su potencial ventana terapéutica al aumentar la dosis máxima que se puede administrar de forma segura. Debido a que tanto las respuestas inmunes no deseadas como las toxicidades no específicas pueden plantear problemas significativos de seguridad y/o eficacia para una terapia farmacológica, a menudo es deseable reducir o minimizar las probabilidades de ambas cuando se

55

60

65

desarrollan moléculas terapéuticas.

[0006] La estabilidad de una molécula terapéutica o de diagnóstico en el tiempo y en entornos específicos (por ejemplo, el sistema circulatorio humano) son características importantes y puede afectar para aquellas aplicaciones a las que una molécula puede emplearse a la práctica. Para ciertas inmunotoxinas o fusiones ligando-toxina, la estabilidad del enlace entre la toxina y otros componentes puede afectar la cantidad de toxicidad no específica causada por la liberación de toxina no dirigida en el tiempo dentro del cuerpo de un organismo multicelular. Por lo tanto, para moléculas que comprenden componentes de toxina, ciertas toxicidades no específicas están directamente relacionadas con la estabilidad de la conexión entre el componente de toxina y otro componente, tal como, por ejemplo, un componente de reconocimiento celular.

[0007] Las toxinas Shiga se pueden combinar con epítomos heterólogos para crear agentes terapéuticos dirigidos a células que administracióm elegidos cargas epítomo para el fin de inducir respuestas inmunes deseables (véase el documento WO 2015/113007). Estas respuestas inmunes pueden ser aprovechadas por moléculas terapéuticas para la destrucción dirigida de tipos de células específicas dentro de un paciente, así como para sensibilizar el sistema inmunitario del paciente para identificar ciertas células como extrañas (es decir, romper la inmunotolerancia). Por ejemplo, la vía de presentación de clase I de histocompatibilidad mayor (MHC) puede ser explotada por dichos enfoques para inducir el reclutamiento de células inmunes a loci tumorales dentro de un paciente y para mejorar el reconocimiento de ciertas células neoplásicas por mecanismos de vigilancia inmunológica.

[0008] Sería deseable tener polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga con baja antigenicidad, baja inmunogenicidad y/o que comprendan epítomos heterólogos, pero que retengan un nivel significativo de una función o funciones de toxina Shiga, tales como, por ejemplo, citotoxicidad potente, la capacidad de forzar la internalización celular y/o la capacidad de enrutar eficientemente a una ubicación o ubicaciones intracelulares deseadas. Además, sería deseable tener moléculas terapéuticas y/o diagnósticas que comprendan componentes derivados de la subunidad A de la toxina Shiga que tengan baja antigenicidad, baja inmunogenicidad, alta estabilidad, baja toxicidad inespecífica y/o la capacidad de suministrar cargas de péptido-epítomo para presentación por el sistema MHC clase I de una célula diana. En particular, sería deseable tener moléculas de reconocimiento celular que comprendan componentes derivados de la subunidad A de la toxina Shiga que mantengan una citotoxicidad potente mientras 1) reducen el potencial de antigenicidades y/o inmunogenicidades no deseadas, 2) reducen el potencial de toxicidades no específicas, y/o 3) tener la capacidad de administrar cargas de péptido-epítomo para su presentación por el sistema MHC de clase I de una célula diana.

### 35 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN

[0009] Las estructuras derivadas de subunidad A de toxina Shiga de la presente invención comprenden cada una una combinación de características (por ejemplo, de-inmunizado sub-región (es), un epítomo heterólogo que comprende sub-región (s), un sub- resistente a la proteasa de escisión región, y/o un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal) que los hacen más útiles, como, por ejemplo, como componentes de moléculas que se dirigen a las células como las inmunotoxinas y las fusiones de ligando-toxina. Ciertas combinaciones de polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención son más útiles porque proporcionan varias funciones efectoras de toxina Shiga en un solo polipéptido, tales como, por ejemplo, promover la internalización celular, dirigir el enrutamiento subcelular hacia el citosol, la inactivación de ribosomas y/o administrando epítomos heterólogos de células T a la vía de clase MHC I de una célula. Ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son más útiles porque proporcionan una combinación de varias propiedades en una sola molécula, tales como, por ejemplo, internalización celular eficiente, citotoxicidad de reconocimiento celular potente, citotoxicidad selectiva, desinmunización, baja no toxicidad específica a altas dosis, alta estabilidad, hiperinmunización de células T CD + y/o la capacidad de administrar un epítomo (s) de células T heterólogo a la ruta de clase MHC I de una célula diana.

[0010] A continuación se describen diferentes realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención con referencia a conjuntos de realizaciones numeradas del 1 al 11.

#### Conjunto de realizaciones No. 1: Polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado que comprende un epítomo de células T heterólogo integrado o insertado

[0011] La presente invención proporciona un polipéptido inmunizado de-, Shiga toxina efector que comprende al menos un insertado o integrado, epítomo heterólogo (a) y al menos un perturbado, endógeno, de células B y o región epítomo/T de células CD4 + (b), en el que el epítomo heterólogo no se solapa con al menos una región del epítomo de células B y/o de células T CD4 + alteradas, endógenas; y en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de la toxina Shiga (véase, por ejemplo, la Figura 1, que representa ejemplos ilustrativos de tres, realizaciones de ejemplo del polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado de esta realización, el conjunto # 1 de toxina Shiga marcada efector 1, 2 y 3). En ciertas realizaciones adicionales, el

epítipo heterólogo es un epítipo de células T CD8 + capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo en (a) está integrado y reemplaza un número equivalente de residuos de aminoácidos en una región de polipéptido de toxina Shiga de tipo salvaje de modo que el polipéptido efector de toxina Shiga tiene el mismo número total de residuos de aminoácidos que tiene la región de polipéptido de toxina Shiga de tipo salvaje de la que se deriva. En ciertas realizaciones adicionales de cualquiera de los anteriores, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga seleccionada entre: dirigir el enrutamiento intracelular a un citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibir una función ribosómica, que inactiva enzimáticamente un ribosoma y citotoxicidad.

[0012] En ciertas realizaciones, el, Shiga toxina polipéptido efector desinmunizado de la presente invención comprende (i) un incorporado o insertado,, epítipo de células T heterólogo y (ii) una alteración de al menos una, endógeno, B- epítipo de células y/o células T que no se solapa con el epítipo de células T heterólogo integrado o insertado. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función del ribosoma, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es un epítipo de células T CD8 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo endógeno de células T es un epítipo de células T CD4 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano.

[0013] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención comprende (i) un incorporado o insertado epítipo de células T heterólogo y (ii) una alteración de al menos una, endógeno, B- región del epítipo de células y/o células T que no se superpone con el epítipo de células T heterólogo integrado o insertado. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función ribosómica, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es un epítipo de células T CD8 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, la región del epítipo de células T endógenas es una región del epítipo de células T CD4 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano.

[0014] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina shiga desinmunizado de la presente invención comprende (i) un incorporado o insertado,, epítipo de células T heterólogo y (ii) una alteración de al menos una, endógeno, B- epítipo de células y/o células T que no se solapa con el epítipo de células T heterólogo integrado o insertado. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función ribosómica, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es un epítipo de células T CD8 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo endógeno de células T es un epítipo de células T CD4 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano.

[0015] En ciertas realizaciones, el, Shiga toxina polipéptido efector inmunizado de-de la presente invención comprende (i) un incorporado o insertado,, epítipo de células T heterólogo y (ii) una alteración de al menos una, endógeno, B- región del epítipo de células y/o células T que no se superpone con el epítipo de células T heterólogo integrado o insertado. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función ribosómica, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es un epítipo de células T CD8 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, la región del epítipo de células T endógenas es una región del epítipo de células T CD4 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano.

[0016] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación, con relación a una subunidad A de toxina Shiga A de tipo salvaje, en la región de epítipo de células B y/o células T seleccionada del grupo de regiones de la subunidad A de la toxina Shiga situadas de forma nativa que

- consisten en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y 210-218 de SEQ ID NO: 3; 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4-33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 34-78 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 77-103 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 128-168 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 160-183 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 236-258 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 274-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, no hay alteración que sea un truncamiento carboxi-terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos un epítipo y/o regiones de epítipo de células B y/o células T endógenas, alteradas.
- 15 [0017] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación, con relación a una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, en el residuo de aminoácidos inmunógeno de células B seleccionado del grupo de residuos de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga situada en forma nativa: L49, D197, D198, R204 y R205.
- 20 [0018] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el epítipo de células T heterólogo, integrado o insertado, altera la región del epítipo de células B y/o células T endógena se selecciona del grupo de regiones de la subunidad A de la toxina Shiga situado de forma nativa, que consiste en: (i) 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; y 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en la que no hay alteración que sea un truncamiento amino-terminal de secuencias que se superponen con parte o la totalidad de al menos una región de epítipo alterada; (ii) 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 210-218 de SEQ ID NO: 3; y (iii) 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma.
- 30 [0019] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación, con relación a una subunidad A de toxina Shiga A de tipo salvaje, en la región de epítipo de células B y/o células T seleccionada del grupo de regiones de la subunidad A de la toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en: (i) 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; y 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en la que no hay alteración, que sea un truncamiento amino-terminal de secuencias que se superponen con parte o la totalidad de al menos una región de epítipo alterada; (ii) 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 210-218 de SEQ ID NO: 3; y (iii) 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en la que no hay alteración, que sea un truncamiento amino-terminal de secuencias que se superponen con parte o la totalidad de al menos una región de epítipo alterada.
- 45 [0020] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una alteración de al menos una región epítipo endógena seleccionada del grupo de subunidad A de la toxina Shiga situada de forma nativa que consiste en: 94 a 115 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o 210-218 de SEQ ID NO: 3.
- 50 [0021] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende una clase heterólogo, MHC I restringido, epítipo de células T. Los epítipos de células T restringidos a MHC de clase I son conocidos en la técnica o pueden ser pronosticados por un experto en la materia. El término heterólogo se refiere a epítipos de células T restringidos por MHC de clase I que no están presentes de forma nativa en las subunidades de la toxina A Shiga de tipo salvaje, tales como, por ejemplo, la subunidad de la toxina A Shiga de tipo salvaje que está más estrechamente relacionada con la Shiga polipéptido efector de toxinas de interés.
- 60 [0022] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende alteraciones de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más regiones de epítipo de células B y/o células T endógenas.

[0023] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, una o más alteraciones comprenden una sustitución de residuo de aminoácido con respecto a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje.

5 [0024] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, una o más regiones de epítipo de células B y/o células T endógenas comprenden una pluralidad de sustituciones de residuos de aminoácidos con relación a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje A.

10 [0025] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, al menos una, dos, tres, o cuatro alteraciones comprenden una pluralidad de sustituciones de residuos de aminoácidos en la región epítipo de células B y/o células T endógenas con relación a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje.

15 [0026] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, al menos una alteración comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más sustituciones de residuos de aminoácidos con relación a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, y opcionalmente en la que se produce al menos una sustitución está en el residuo de aminoácido de la subunidad A de la toxina Shiga situada de forma nativa seleccionada del grupo que consiste en: 1 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 6 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 12 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 44 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 46 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 50 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 51 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 54 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 56 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 57 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 84 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 88 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 104 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 105 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 107 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 108 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 111 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 154 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 185 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 197 de SEQ ID NO: 3; 198 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 248 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de SEQ ID NO: 3; 251 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o el residuo de aminoácido equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, al menos dos alteraciones comprenden cada una al menos una sustitución de residuos de aminoácidos con respecto a una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje seleccionada del grupo que consiste en: 1 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 197 de SEQ ID NO: 3; 198 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 250 de SEQ ID NO: 3; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o el residuo de aminoácido equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma.

65 [0027] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende la alteración de al menos tres regiones de epítipo de células B y/o células T endógenas seleccionadas de entre el

grupo que consiste en: (i) 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; y 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en el que no hay alteración que sea un truncamiento amino terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos una región epitópica de células B y/o células T endógena alterada; (ii) 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 210-218 de SEQ ID NO: 3; y (iii) 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en el que no hay alteración que sea un truncamiento carboxi-terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos un epítipo y/o región epitópica de células B y/o células T endógena alterada.

[0028] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende alteraciones de al menos dos regiones de epítipo de células B y/o endógenas, en el que cada alteración comprende uno o más sustituciones de residuos de aminoácidos, y en el que las regiones de epítipo de células B y/o células T endógenas se seleccionan del grupo de regiones de subunidad A de toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en: 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma.

[0029] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el epítipo de células T heterólogo integrado o insertado no altera ninguna región de epítipo de células B y/o células T CD4+ endógenas descrita en el presente documento.

[0030] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, al menos una alteración comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácido con relación a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje se selecciona del grupo que consiste en: D a A, D a G, D a V, D a L, D a I, D a F, D a S, D a Q, D a M, D a R, E a A, E a G, E a V, E a L, E a I, E a F, E a S, E a Q, E a N, E a D, E a M, E a R, F a A, F a G, F a V, F a L, F a I, G a A, G a P, H a A, H a G, H a V, H a L, H a I, H a F, H a M, I a A, I a V, I a G, I a C, K a A, K a G, K a V, K a L, K a I, K a M, K a H, L a A, L a V, L a G, L a C, N a A, N a G, N a V, N a L, N a I, N a F, P a A, P a G, P a F, R a A, R a G, R a V, R a L, R a I, R a F, R a M, R a Q, R a S, R a K, R a H, S a A, S a G, S a V, S a L, S a I, S a F, S a M, T a A, T a G, T a V, T a L, T a I, T a F, T a M, T a S, V a A, V a G, Y a A, Y a G, Y a V, Y a L, Y a I, Y a F, Y a M e Y a T. En ciertas realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje se selecciona del grupo que consiste en: D a A, D a G, D a V, D a L, D a I, D a F, D a S, D a Q, E a A, E a G, E a V, E a L, E a I, E a F, E a S, E a Q, E a N, E a D, E a M, E a R, G a A, H a A, H a G, H a V, H a L, H a I, H a F, H a M, K a A, K a G, K a V, K a L, K a I, K a M, K a H, L a A, L a G, N a A, N a G, N a V, N a L, N a I, N a F, P a A, P a G, P a F, R a A, R a G, R a V, R a L, R a I, R a F, R a M, R a Q, R a S, R a K, R a H, S a A, S a G, S a V, S a L, S a I, S a F, S a M, T a A, T a G, T a V, T a L, T a I, T a F, T a M, T a S, Y a A, Y a G, Y a V, Y a L, Y a I, Y a F e Y a M.

[0031] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, al menos una de la alteración o alteraciones comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácido con respecto a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje seleccionada del grupo que consiste en: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; D6 a A, G, V, L, I, F, S, Q y R; S8 a A, G, V, I, L, F y M; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; T12 a A, G, V, I, L, F, M, S y K; S12 a A, G, V, I, L, F y M; S33 a A, G, V, L, I, F, M y C; S43 a A, G, V, L, I, F y M; G44 a A o L; S45 a A, G, V, L, I, F y M; T45 a A, G, V, L, I, F y M; G46 a A y P; D47 a A, G, V, L, I, F, S, M y Q; N48 a A, G, V, L, M y F; L49 a A, V, C y G; Y49 a A, G, V, L, I, F, M y T; F50 a A, G, V, L, I y T; A51 a V; D53 a A, G, V, L, I, F, S y Q; V54 a A, G, I y L; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; G56 a A y P; 157 a A, G, V y M; L57 a A, V, C, G, M y F; D58 a A, G, V, L, I, F, S y Q; P59 a A, G y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, T y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; R84 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; V88 a A y G; 188 a A, V, C y G; D94 a A, G, V, L, I, F, S y Q; S96 a A, G, V, I, L, F y M; T104 a A, G, V, L, I, F, M; y N; A105 a L; T107 a A, G, V, L, I, F, M y P; S107 a A, G, V, L, I, F, M y P; L108 a A, V, C y G; S109 a A, G, V, I, L, F y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D111 a A, G, V, L, I, F, S, Q y T; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D141 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G147 a A; V154 a A y G. R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S y Q; L185 a A, G, V y C; S186 a A, G, V, I, L, F y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S189 a A, G, V, I, L, F y M; D197 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D198 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

[0032] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 355-369, que comprende además una

alteración de al menos una, región de epítipo de células T y/o células B endógenas, que no se solapa con un epítipo de células T CD8+ heterólogo integrado o insertado.

5 [0033] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 6-32, 340-354, y 370-438.

10 [0034] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de exhibir (i) un nivel de actividad catalítica comparable a un fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje o polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje, (ii) una actividad de inhibición de ribosomas con un valor de concentración inhibitoria semimáxima (IC<sub>50</sub>) de 10.000 picomolar o menos, y/o (iii) un nivel significativo de actividad catalítica de toxina Shiga.

15 [0035] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de exhibir eficiencia de enrutamiento subcelular comparable con un polipéptido efector de la toxina Shiga tipo salvaje y/o capaz de exhibir un nivel significativo de actividad de enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o citosol desde una ubicación de inicio endosomal de una célula.

20 [0036] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de suministro intracelular del epítipo de células T heterólogo, integrado o insertado, desde un compartimento endosomal temprano a una molécula de MHC de clase I de una célula en la que el polipéptido efector de toxina Shiga está presente. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir una o más funciones efectoras de toxina Shiga además del suministro intracelular, tales como, por ejemplo, las funciones efectoras de toxina Shiga de: promover la internalización celular, dirigir el enrutamiento subcelular al citosol, la inactivación del ribosoma, inducir la actividad caspasa, causar citostasis y/o causar la muerte celular. En  
25 ciertas realizaciones adicionales, el epítipo de células T heterólogo es un epítipo de células T CD8 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmunitario humano.

30 [0037] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una alteración de al menos dos regiones epítipo endógenas seleccionadas del grupo de regiones de subunidad A de toxina Shiga situadas de forma nativa que consiste en: 94 a 115 de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o 210-218 de SEQ ID NO: 3; en donde la alteración no consiste únicamente en la sustitución de residuos de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: S96Y de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; Y114S de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179A de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179H de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; L185A de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R188A de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R205A de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R179A/R188A de SEQ ID NO: 1; o SEQ ID NO: 2; o A188V de SEQ ID NO: 3.

40 [0038] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una alteración que comprende una mutación de al menos un residuo de aminoácido en al menos una, la región epítipo endógeno seleccionado del grupo de forma nativa posicionado de toxina Shiga regiones una subunidad que consiste en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende el truncamiento del extremo amino terminal que se solapa con la región del epítipo alterado mencionado anteriormente.  
45

[0039] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una alteración que comprende una mutación de al menos un residuo de aminoácido en al menos dos, regiones de epítipo endógenos seleccionados de entre el grupo de forma nativa posicionado de toxina Shiga regiones una subunidad que consiste en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; en donde la alteración no consiste únicamente en la sustitución del residuo de aminoácido R63W de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y en el que la región efectora de la toxina Shiga no comprende el truncamiento del extremo amino terminal que se solapa con las dos regiones del epítipo alteradas mencionadas anteriormente.  
50  
55

[0040] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una alteración que comprende una mutación de al menos un residuo de aminoácido en al menos una, la región epítipo endógeno seleccionado del grupo de forma nativa posicionado de toxina Shiga regiones una subunidad que consiste en: 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende truncamiento del extremo carboxi terminal superpuesto con la región del epítipo alterado anteriormente mencionada.  
60

65 [0041] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende



una alteración que comprende una mutación de al menos un residuo de aminoácido en al menos dos, regiones de epítipo endógenos seleccionados de entre el grupo de forma nativa posicionado de toxina Shiga regiones una subunidad que consiste en: 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende la mutación seleccionada del grupo que consiste en: R248H de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; A250V de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R251H de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; A253G de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; S254T de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; C261A de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R289K de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; R248H y R251H de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; A253G y S254T de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; la eliminación de S247-M252 de SEQ ID NO: 1; S246F de la SEQ ID N.º: 3; A282V de SEQ ID NO: 3; I291V de SEQ ID NO: 3; S246F de SEQ ID N.º: 3; y en el que el polipéptido efector de toxina Shiga no comprende truncamiento del extremo carboxi terminal solapado con las dos regiones del epítipo alteradas mencionadas anteriormente.

[0042] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 6-27, 29-32, 340-354, y 370-438.

[0043] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención comprende una o más mutaciones con respecto a un origen natural una subunidad de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia una actividad enzimática de la toxina Shiga polipéptido efector, la mutación seleccionada de al menos una eliminación, inserción o sustitución de residuos de aminoácidos. En ciertas realizaciones adicionales, la mutación relativa a la Subunidad A que ocurre de forma natural reduce o elimina una actividad citotóxica del polipéptido efector de toxina Shiga pero el polipéptido efector de toxina Shiga retiene al menos otra función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, promover la internalización celular. y/o dirigir el enrutamiento intracelular a cierto compartimento (s) subcelular (es). En ciertas realizaciones adicionales, la mutación relativa a la Subunidad A natural 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.

[0044] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido comprende la toxina efector Shiga (i) un fragmento de la toxina A1 de Shiga derivé región que tiene una extremo carboxi terminal y (ii) un motivo alterado furina de escisión en el extremo carboxi-terminal de la A1 región de fragmentos En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterada comprende una o más mutaciones, en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, la mutación altera al menos un residuo de aminoácido en una región situada de forma nativa en 248-251 de la subunidad A de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o en 247-250 de la subunidad A de toxina similar a Shiga (SEQ ID NO: 3); o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje, en un sitio de escisión por furina mínimo del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, el sitio de escisión por furina mínimo está representado por la secuencia de aminoácidos consenso R/YxxR y/o RxxR.

[0045] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido comprende la toxina efector Shiga (i) un fragmento de la toxina A1 de Shiga derivé región que tiene una extremo carboxi terminal y (ii) un motivo alterado furina de escisión en el extremo carboxi-terminal de la A1 región de fragmentos En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una sustitución de residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina en relación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina con un residuo de aminoácido no cargado positivamente seleccionado del grupo que consiste en: alanina, glicina, prolina, serina, treonina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, triptófano y tirosina. En ciertas realizaciones, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina con una histidina.

[0046] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector toxina Shiga, ya sea solo o como un componente de una primera molécula de reconocimiento celular, es capaz cuando se introducen en células de exhiben citotoxicidad comparable a la citotoxicidad de un tipo salvaje El polipéptido de la toxina Shiga A1 y/o la segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la primera molécula de reconocimiento celular, a excepción de todos sus componentes del polipéptido efector de la toxina Shiga, cada uno comprende un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje.

[0047] Para ciertas realizaciones del polipéptido efector de la toxina Shiga del conjunto de realizaciones # 1, una molécula de reconocimiento celular de la presente invención que comprende el polipéptido de toxina Shiga efector es capaz cuando se introducen en un cordado de exhibir mejorado, en tolerabilidad vivo en comparación con una segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la primera molécula de reconocimiento celular, excepto por todos sus componentes polipeptídicos efectores de toxina Shiga, cada uno de los cuales comprende un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje y/o un sitio de escisión por furina de toxina Shiga de tipo salvaje en el

sitio extremo carboxi terminal de su región de fragmento A1.

5 [0048] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención comprende una región de Shiga toxina efector derivado de aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o ID SEC NUMERO 3.

10 [0049] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 1, el polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención comprende una región de Shiga toxina efector derivado de los aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o ID SEC NUMERO 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.

15 Conjunto de realizaciones # 2 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado que comprende un epítipo de células T heterólogo, integrado o insertado y una subregión desinmunizada no solapante

20 [0050] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, cada una que comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a un biomolécula diana extracelular y (ii) una de inmunizados, Shiga polipéptido toxina efector del conjunto de realizaciones # 1 (véase por ejemplo la figura 1, que representa ejemplos ilustrativos de cuatro realizaciones de ejemplo de las moléculas de reconocimiento celular de este conjunto de realizaciones # 2). Por ejemplo, ciertas realizaciones del conjunto n. ° 2 son la molécula de reconocimiento celular que comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular y (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado que comprende al menos un inserto o integrado, epítipo heterólogo (a) y al menos un epítipo de células T endógeno, de células B y/o CD4 + alterado, (b), en el que el epítipo heterólogo no se solapa con el epítipo de células T heterólogo integrado o insertado. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función del ribosoma, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es un epítipo de células T CD8 +, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: ingresar a una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis, causar la muerte celular y/o administrar el heterólogo integrado o insertado, Epítipo de células T a una molécula MHC de clase I para presentación en una superficie celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una citotoxicidad comparable o mejor que una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto para todos sus componentes de polipéptido efector de toxina Shiga comprenden cada uno un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje.

45 [0051] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular comprende un resto molecular situado carboxi-terminal al extremo carboxi-terminal de la región del fragmento A1 de toxina Shiga.

50 [0052] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz cuando se introducen en un cordado de exhibir mejorada in vivo la tolerabilidad y/o la estabilidad en comparación con una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular a excepción de todos sus componentes polipeptídicos efectores de la toxina Shiga, cada uno de los cuales comprende un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje y/o un sitio de escisión por furina de la toxina Shiga de tipo salvaje en el carboxi término de su región de fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga no es citotóxico y el resto molecular es citotóxico.

55 [0053] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están unidos entre sí, ya sea directamente o indirectamente.

60 [0054] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la región de unión comprende un polipéptido que comprende una región de tipo inmunoglobulina de unión. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: un dominio V<sub>H</sub> autónomo, fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), nanocuerpo, dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un camélido (V<sub>H</sub>H o V<sub>H</sub> Fragmento de dominio<sub>H</sub>), dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un pez cartilaginoso (fragmento de dominio V<sub>H</sub>H o V<sub>H</sub>), nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento V<sub>NAR</sub>, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), fragmento variable de anticuerpo (Fv), fragmento determinante complementario de la región 3 (CDR3), polipéptido FR3-CDR3-FR4 restringido (FR3-CDR3-FR4), fragmento Fd,

dominio inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), fragmento de unión a antígeno (Fab), polipéptido repetido de armadillo (ArmRP), fibronectina-deriva 10<sup>o</sup> dominio de fibronectina de tipo III (10Fn3), tenascina tipo III de dominio (TNfn3), dominio motivo de repetición de anquirina, lipoproteína-receptor derivado de baja densidad A-dominio (LDLR-A), lipocalina (anticalina), dominio Kunitz, dominio Z derivado de proteína A, gamma-B cr dominio derivado de isstallina, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d (affitin), dominio SH2 derivado de Fyn, miniproteína, andamiaje de dominio tipo lectina tipo C, imitación de anticuerpos modificados genéticamente y cualquier homólogo manipulado genéticamente de cualquiera de los anteriores que conservar la funcionalidad de unión.

5 [0055] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir (i) un nivel de actividad catalítica comparable a un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje o un polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje, (ii) un ribosoma inhibición de la actividad con un valor de concentración inhibidora semimáxima (IC<sub>50</sub>) de 10 000 picomolar o menos, y/o (iii) un nivel significativo de la actividad catalítica de la toxina Shiga.

15 [0056] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención y/o su polipéptido de toxina Shiga efector es capaz de exhibir subcelular eficiencia de enrutamiento comparable a una molécula de reconocimiento celular de referencia que comprende una de tipo salvaje Shiga fragmento de toxina A1 o polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje y/o capaz de exhibir un nivel significativo de actividad de enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o citosol desde una ubicación de inicio endosomal de una célula.

25 [0057] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, con lo que la administración de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una célula acoplado físicamente con la biomolécula diana extracelular de región de unión de la molécula de reconocimiento celular, la molécula de reconocimiento celular es capaz de causar la muerte de la célula. En ciertas realizaciones adicionales, la administración de la molécula de reconocimiento celular de la invención a dos poblaciones diferentes de tipos de células que difieren con respecto a la presencia o nivel de la biomolécula objetivo extracelular, la molécula de reconocimiento celular es capaz de causar la muerte celular a los tipos de célula acoplados físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular citotóxica en un CD<sub>50</sub> al menos tres veces o menos que el CD<sub>50</sub> a tipos de células que no están físicamente acoplados con una biomolécula diana extracelular de la célula dirigida a la región de unión de la molécula. Para ciertas realizaciones, mediante las cuales la administración de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una primera población de células cuyos miembros están físicamente acoplados a biomoléculas diana extracelulares de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular, y una segunda población de células cuyos miembros no son acoplado físicamente a cualquier biomolécula diana extracelular de la región de unión, el efecto citotóxico de la molécula de reconocimiento celular a los miembros de dicha primera población de células en relación con los miembros de dicha segunda población de células con respecto a los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor. Para ciertas realizaciones, mediante las cuales la administración de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una primera población de células cuyos miembros están físicamente acoplados a una cantidad significativa de la biomolécula objetivo extracelular de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular, y una segunda población de células cuyos miembros no están físicamente acoplados a una cantidad significativa de ninguna biomolécula diana extracelular de la región de unión, el efecto citotóxico de la molécula de reconocimiento celular 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 molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una primera población de células positivas para biomolécula diana, y una segunda población de células cuyos miembros no expresan una cantidad significativa de una biomolécula diana de la molécula de reconocimiento celular región de unión en una superficie celular, el efecto citotóxico de la molécula de reconocimiento celular a 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.

50 [0058] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz cuando se introducen en células de exhiben una citotoxicidad con un valor de concentración inhibidora semimáxima (CD<sub>50</sub>) de 300 nM o menos y/o capaz de exhibir un nivel significativo de citotoxicidad de toxina Shiga.

55 [0059] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de administrar una, heterólogo, epítipo de células T CD8 + integrado o insertado a una clase I ruta de presentación de MHC de una célula para de célula Presentación superficial del epítipo unido por una molécula MHC de clase I.

60 [0060] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular comprende un resto molecular asociado con el carboxi-terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones, el resto molecular comprende o consiste en la región de unión. En ciertas realizaciones, el resto molecular comprende al menos un aminoácido y el polipéptido efector de toxina Shiga está unido a al menos un

residuo de aminoácido del resto molecular. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular y el polipéptido efector de toxina Shiga se fusionan formando un polipéptido continuo.

5 [0061] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la célula de segmentación comprende además molécula un resto molecular citotóxico asociado con el carboxi-terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones, el resto molecular citotóxico es un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de molécula pequeña, agente antineoplásico, antibiótico citotóxico, agente alquilante, antimetabolito, inhibidor de topoisomerasa y/o inhibidor de tubulina conocido por el experto. y/o descrito aquí. Para ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular citotóxico es citotóxico a concentraciones inferiores a 10.000, 10  
10 5.000, 1.000, 500 o 200 pM.

[0062] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la región de unión es capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionado del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD74, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EphA2, EphB2, antígeno de membrana prostático específico, Cripto, CDCP1, 15 endogлина, proteína de activación de fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, CD133, gpA33, mucina, TAG-72, tirosina -receptor transmembrana de 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, c-MET IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANGO, FAP, tenascina, CD64, mesotelina, BRCA1, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, 20 NY-ESO-1, CDK-4, beta-catenina, MUM-1, caspasa-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno carcinoembrionario, antígeno prostático específico, antígeno prostático de células madre, aspartililo humano (asparagilo) beta-hidroxilasa, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART-1/MelanA, gp100, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus de Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfa-fetoproteína, 17-A1, antígeno tumoral de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD45 (receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C), CD53, CD88, CD129, 25 CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, galectina-9, IL-1R (receptor de interleucina-1), mrp-14, ligando NKG2D, ligando de muerte programada 1 (PD-L1), Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, FcεRIa, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, CD11a-c, GITRL, molécula MHC clase I, molécula MHC clase II (opcionalmente complejo con un péptido), CD284 (TLR4), CD107-Mac3, CD195 (CCR5), HLA-DR, CD16/32, CD282 (TLR2), CD11c y cualquier 30 fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores.

[0063] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la región de unión está unido, ya sea directa o indirectamente, al polipéptido de toxina Shiga efector por al menos un enlace covalente que no es un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se fusiona, directa o indirectamente, al extremo 35 carboxi terminal del polipéptido efector de toxina Shiga para formar un polipéptido único y continuo. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión es una región de unión de tipo inmunoglobulina.

[0064] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, el alterado furina-escisión motivo comprende una o más mutaciones en el mínimo, la furina de escisión de sitio con respecto a una de toxina Shiga de tipo salvaje A 40 Subunidad. En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado no es un truncamiento amino-terminal de secuencias que se solapan con parte o la totalidad de al menos un residuo de aminoácido del sitio de escisión por furina mínimo. En ciertas realizaciones, la mutación en el sitio mínimo de escisión con furina es una delección, inserción y/o sustitución de aminoácidos de al menos un residuo de aminoácido en el motivo de escisión con furina R/YxxR. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterada comprende al menos una 45 mutación con respecto a una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje, la mutación altera al menos un residuo de aminoácido en la región situada de forma nativa 1) en 248-251 de la A Subunidad de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o 2) en 247-250 de la Subunidad A de toxina Shiga-like 2 (SEQ ID NO: 3), o la posición de secuencia de aminoácidos equivalente en cualquier subunidad A de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la mutación es una sustitución de un residuo de aminoácido de un residuo de arginina con un residuo de aminoácido no cargado positivamente. 50

[0065] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz cuando se introducen en células de exhiben citotoxicidad comparable a una 55 citotoxicidad de una molécula de referencia, tales como, por ejemplo, una segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular a excepción de todos sus componentes polipeptídicos efectores de la toxina Shiga, cada uno de los cuales comprende un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje.

[0066] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la región de unión comprende el péptido o polipéptido mostrado en cualquiera de las SEQ ID NO: 83-339. En ciertas realizaciones adicionales, la región de 60 unión comprende o consiste esencialmente en el polipéptido representado por cualquiera de los siguientes: aminoácidos 1-245 de cualquiera de las SEQ ID NO: 33, 64 y 65; 269-513 de SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 80; aminoácidos 269-520 o 269-521 de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 66 y 67; aminoácidos 1-232, 1-233, 1-234, 1-235, 1-236, 1-242, 1-243, 1-244, 1-245, 1-246, 1-252, 1-253, 1-254, 1-255 o 1-256 de cualquiera de las SEQ ID NO: 47-119 y 176-248; aminoácidos 269-498 o 269-499 de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-39, 68-79 y 65 81; aminoácidos 269-499, 269-512, 269-513 o 280-510 de cualquiera de las SEQ ID NO: 34, 35, 41-56 y 82.

[0067] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de SEQ ID NOs: 43-62, 64-82, y 439-513.

[0068] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la región de unión cubre estéricamente el carboxi-terminal de la región fragmento A1.

[0069] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, el resto molecular cubre estéricamente el carboxi-terminal de la región fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende la región de unión.

[0070] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión y/o resto molecular situado carboxi-terminal al extremo carboxi-terminal de la región fragmento de toxina A1 de Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la masa de la región de unión y/o resto molecular es al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más.

[0071] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular comprende una región de unión con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento (por ejemplo, citotoxicidad y/o enrutamiento intracelular).

[0072] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la región de unión está comprendido dentro de un resto relativamente grande, molecular que comprende tal como, por ejemplo, un resto molecular con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento.

[0073] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, el amino-terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga es en y/o proximal a un extremo amino terminal de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no está situada proximal al extremo amino de la molécula de reconocimiento celular con respecto al polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están físicamente dispuestos u orientados dentro de la molécula de reconocimiento celular de manera que la región de unión no se encuentra proximal al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se localiza dentro de la molécula de reconocimiento celular más próxima al extremo carboxi del polipéptido efector de la toxina Shiga que al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad que es mayor que la de una tercera molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino y que comprende la región de unión y el efector de toxina Shiga polipéptido que no está posicionado o cerca del extremo amino de la tercera molécula de reconocimiento celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención exhibe citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, citotoxicidad 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más en comparación con la citotoxicidad de la tercera molécula de reconocimiento celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención para una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 doble, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la tercera molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>. En ciertas realizaciones adicionales, la tercera molécula de reconocimiento celular no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de la familia KDEL.

[0074] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, el amino-terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga es en y/o proximal a un extremo amino terminal de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no está ubicada proximal al extremo amino de la molécula de reconocimiento celular en relación con el polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están físicamente dispuestos u orientados dentro de la molécula de reconocimiento celular de modo que la región de unión no se encuentra proximal al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se localiza dentro de la molécula de reconocimiento celular más próxima al extremo carboxi del polipéptido efector de la toxina Shiga que al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxica y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplásmico y/o citosol en comparación con la eficiencia de

5 enrutamiento subcelular de una tercera molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino terminal y que comprende la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga que no está posicionado en el extremo amino terminal de la tercera molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la tercera molécula de reconocimiento celular no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de la familia KDEL.

10 [0075] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, el amino-terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga es en y/o proximal a un extremo amino terminal de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no está ubicada proximal al extremo amino de la molécula de reconocimiento celular en relación con el polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están físicamente dispuestos u orientados dentro de la molécula de reconocimiento celular de manera que la región de unión no se encuentra proximal al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se localiza dentro de la molécula de reconocimiento celular más próxima al extremo carboxi del polipéptido efector de la toxina Shiga que al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención exhibe una potencia citotóxica baja (es decir, no es capaz cuando se introduce en ciertos tipos de células diana positivas de exhibir una citotoxicidad mayor del 1% de muerte celular de una población celular en una segmentación celular concentración de molécula de 1000 nM, 500nM, 100 nM, 75 nM o 50 nM) y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplásmico y/o citosol en comparación a la eficiencia de enrutamiento subcelular de una tercera molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino terminal y que comprende la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga que no está posicionado o cerca del extremo amino terminal de la tercera molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la tercera molécula de reconocimiento celular no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de la familia KDEL.

30 [0076] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 2, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o un componente polipeptídico de la misma, comprende una, retención en el retículo endoplásmico/motivo señal de recuperación carboxi-terminal de un miembro de la familia KDEL. Para ciertas realizaciones adicionales, el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal se selecciona del grupo que consiste en: KDEL, HDEF, HDEL, RDEF, RDEL, WDEL, YDEL, HEEF, HEEL, KEEL, REEL, KAEL, KCEL, KFEL, KGEL, KHEL, KLEL, KNEL, KQEL, KREL, KSEL, KVEL, KWEL, KYEL, KEDL, KIEL, DKEL, FDEL, KDEF, KKEL, HADL, HAEL, HIEL, HNEL, HTEL, KTEL, HVEL, NDEL, QDEL, REDL, RNEL, RTDL, RTEL, SDEL, TDEL, SKEL, STEL y EDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad que es mayor que la de una cuarta molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto porque no comprende ningún carboxi -terminal, retículo endoplásmico/motivo señal de recuperación de la familia KDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más citotoxicidad en comparación con una molécula de referencia, como, por ejemplo, la cuarta molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 doble, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la cuarta molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>.

50 Conjunto de realizaciones # 3 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi-terminal y un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado

55 [0077] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, cada una que comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a un biomolécula diana extracelular; (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un epítipo heterólogo insertado o integrado; y (iii) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal. En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende (a) una región de unión capaz de unirse específicamente al menos a una biomolécula diana extracelular; (b) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un epítipo heterólogo integrado o insertado; y (c) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de un miembro de la familia KDEL. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función del ribosoma, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es un epítipo de células T CD8+, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o

más de los siguientes: ingresar a una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis, causar la muerte celular y/o administrar el heterólogo integrado o insertado, Epítipo de células T a una molécula MHC de clase I para presentación en una superficie celular.

5 [0078] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 3, la retención en el retículo endoplásmico/motivo señal de recuperación carboxi-terminal se selecciona del grupo que consiste en: KDEL, HDEF, HDEL, RDEF, RDEL, WDEL, ydel, HEEF, talón, quilla, CARRETE, KAEL, KCEL, KFEL, KGEL, KHEL, KLEL, RODILLA, KQEL, KREL, KSEL, KVEL, KWEL, KYEL, KEDL, KIEL, DKEL, FDEL, KDEF, KKEL, HADL, HAEL, HIEL, HNEL, HTEL, KTEL, HVEL, NDEL, QDEL, REDL, RNEL, RTDL, RTEL, SDEL, TDEL, SKEL, STEL y EDEL.

10 [0079] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 3, la región integrado o insertado, heterólogas, interrumpe epítipo de células T de la, de células B endógeno y/o epítipo de células T seleccionado de entre el grupo de forma nativa posicionado de toxina Shiga regiones una subunidad que consiste en: (i) 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; y 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma; (ii) 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 210-218 de SEQ ID NO: 3; y (iii) 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma.

25 [0080] En ciertas realizaciones adicionales del conjunto de realizaciones # 3, el epítipo heterólogo es un epítipo de células T CD8 + capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo está integrado y reemplaza un número equivalente de residuos de aminoácidos en una región de polipéptido de toxina Shiga de tipo salvaje de modo que el polipéptido efector de toxina Shiga tiene el mismo número total de residuos de aminoácidos que el tipo salvaje Región del polipéptido de la toxina Shiga de la que deriva. En ciertas realizaciones adicionales de cualquiera de los anteriores, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga seleccionada entre: dirigir el enrutamiento intracelular a un citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibir una función ribosómica, inactivar enzimáticamente un ribosoma, y citotoxicidad.

35 [0081] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 3, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz cuando se introducen en células de exhiben citotoxicidad que es mayor que la de una molécula de reconocimiento celular quinto que consiste en la molécula de reconocimiento celular excepto porque no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de la familia KDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más citotoxicidad en comparación con la quinta molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 doble, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la quinta molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>.

45 [0082] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 3, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de administrar una, heterólogo, epítipo de células T CD8 + integrado o insertado a una clase I ruta de presentación de MHC de una célula para de célula Presentación superficial del epítipo unido por una molécula MHC de clase I.

50 [0083] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 3, la molécula de reconocimiento celular es-de inmunizado debido a la, epítipo heterólogo integrado o insertado. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz de exhibir menos antigenicidad relativa y/o inmunogenicidad relativa en comparación con una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una sexta molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular a excepción que carece de uno o más epítopos integrados o insertados presentes en la molécula de reconocimiento celular.

60 [0084] Para ciertas realizaciones de realización adicional Set # 3, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxico y es capaz cuando se introducen en células de exhiben una subcelular mayor enrutamiento eficiencia desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de una endoplásmico retículo y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, como, por ejemplo, la quinta molécula de reconocimiento celular.

65 Conjunto de realizaciones # 4 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende (i) un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y (ii) un motivo de escisión por furina alterado

[0085] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, cada una que comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a un biomolécula diana extracelular; (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un epítipo heterólogo insertado o integrado; y (iii) un motivo de escisión por furina alterado. En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular; (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende (a) un epítipo heterólogo insertado o integrado; (b) una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 que tiene un extremo carboxi terminal; y (c) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función ribosómica, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es un epítipo de células T CD8+, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: ingresar a una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis, causar la muerte celular y/o administrar el heterólogo integrado o insertado, Epítipo de células T a una molécula MHC de clase I para presentación en una superficie celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en las células, de presentar una citotoxicidad comparable o mejor que una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto para todos sus componentes de polipéptido efector de toxina Shiga comprenden un sitio de escisión por furina de toxina Shiga de tipo salvaje en el extremo carboxilo de su región de fragmento A1.

[0086] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la región integrado o insertado, heterólogas, interrumpe epítipo de células T de la, de células B endógeno y/o epítipo de células T seleccionado de entre el grupo de forma nativa posicionado de toxina Shiga regiones una subunidad que consiste en: (i) 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; y 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma; (ii) 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 210-218 de SEQ ID NO: 3; y (iii) 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma.

[0087] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, alterando la mutación al menos un residuo de aminoácido en una región situada de forma nativa en 248-251 de la Subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o en 247-250 de la Subunidad A de la toxina similar a Shiga (SEQ ID NO: 3); o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, en un sitio de escisión por furina mínimo del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, el sitio de escisión por furina mínimo está representado por la secuencia de aminoácidos consenso R/Y-x-x-R y/o R-x-x-R.

[0088] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular comprende un resto molecular situado carboxi-terminal al extremo carboxi-terminal de la región del fragmento A1 de toxina Shiga.

[0089] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la región de unión cubre estéricamente el extremo carboxi-terminal de la región del fragmento A1.

[0090] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi-terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende la región de unión.

[0091] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión y/o resto molecular situado carboxi-terminal al extremo carboxi-terminal de la región del fragmento A1 de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la masa de la región de unión y/o resto molecular es al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o mayor.

[0092] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular comprende una región de unión con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30



kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento (p. Ej., Citotoxicidad y/o enrutamiento intracelular).

5 [0093] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la región de unión está comprendido dentro de un resto relativamente grande, molecular que comprende tal como, por ejemplo, un resto molecular con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento.

10 [0094] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, el motivo alterado furina de escisión comprende un amino sustitución residuo de ácido en el motivo de furina de escisión con respecto a una de tipo salvaje Shiga toxina A de subunidades. En ciertas realizaciones adicionales, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina con un residuo de aminoácido no cargado positivamente  
15 seleccionado del grupo que consiste en: alanina, glicina, prolina, serina, treonina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, triptófano y tirosina. En ciertas realizaciones, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina con una histidina.

20 [0095] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular es capaz cuando se introducen en células de exhiben citotoxicidad comparable a la citotoxicidad de una molécula de reconocimiento celular séptimo que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto para la totalidad de su Shiga cada uno de los componentes del polipéptido efector de la toxina comprende un fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje y/o un sitio de escisión por furina de la toxina Shiga de tipo salvaje en el extremo carboxilo de  
25 su región del fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz cuando se introduce en células que exhiben citotoxicidad que está en un rango de 0,1 veces, 0,5 veces o 0,75 veces a 1,2 veces, 1,5 veces, 1.75 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces la citotoxicidad exhibida por la séptima molécula de reconocimiento celular.

30 [0096] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular es capaz cuando se introducen en un cordado de exhibir mejorado, en tolerabilidad vivo en comparación con in vivo tolerabilidad de la molécula de reconocimiento celular séptimo.

35 [0097] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular es-de inmunizado debido a la, epítipo heterólogo integrado o insertado. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz de exhibir menos antigenicidad relativa y/o inmunogenicidad relativa en comparación con una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una octava molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular a excepción de que carece de uno o más epítopos integrados o insertados presentes en la molécula de reconocimiento celular.

40 [0098] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular es-de inmunizado debido a la alteración motivo furina-escisión. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz de exhibir menos antigenicidad relativa y/o inmunogenicidad relativa en comparación con una novena molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento  
45 celular, excepto que el motivo de escisión por furina es de tipo salvaje y/o todos los componentes del polipéptido efector de la toxina Shiga consisten en un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje.

50 Conjunto de realizaciones # 5 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga en o cerca de un extremo amino terminal y en donde el polipéptido efector de toxina Shiga comprende un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado

[0099] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, cada una que comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a un biomolécula diana extracelular; (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un epítipo heterólogo insertado o integrado; en donde el polipéptido efector de toxina Shiga está en o cerca de un extremo amino terminal de un polipéptido. En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular, (ii) un componente polipeptídico y (iii) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un inserto insertado o integrado, epítipo heterólogo; en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga está en o cerca de un extremo amino del componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están físicamente dispuestos u orientados dentro de la molécula de reconocimiento celular de manera que la región de unión no se encuentra proximal al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se localiza dentro de la molécula de reconocimiento celular más próxima al extremo carboxi del polipéptido efector de la toxina Shiga que al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. En  
65 ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no está situada proximal a un extremo amino de la molécula de

reconocimiento celular en relación con el polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función ribosómica, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es un epítipo de células T CD8+, tal como, por ejemplo, con respecto a un sistema inmune humano. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T es capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de una célula. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: ingresar a una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis, causar la muerte celular y/o administrar el heterólogo integrado o insertado, Epítipo de células T a una molécula MHC de clase I para presentación en una superficie celular.

[0100] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 5, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad que es mayor que la de una décima molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino y que comprende el región de unión y la región del polipéptido efector de la toxina Shiga que no está posicionada en el extremo amino de la décima molécula de reconocimiento celular o proximal al mismo. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más citotoxicidad en comparación con la décima molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 doble, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la décima molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana como se analiza por los valores de CD50.

[0101] Para ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 5, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de suministrar un epítipo de células T CD8 + heterólogo, integrado o insertado a una ruta de presentación MHC de clase I de una célula para célula- Presentación superficial del epítipo unido por una molécula MHC de clase I.

[0102] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 5, la molécula de reconocimiento celular se desinmuniza debido al epítipo heterólogo integrado o insertado. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz de exhibir menos antigenicidad relativa y/o inmunogenicidad relativa en comparación con una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una undécima molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular a excepción que carece de uno o más epítopos integrados o insertados presentes en la molécula de reconocimiento celular.

[0103] Para ciertas realizaciones adicionales del conjunto de realizaciones # 5, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxica y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplasmático y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, la décima molécula de reconocimiento celular.

Conjunto de realizaciones # 6 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado que comprende un motivo de escisión por furina alterado

[0104] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, cada una que comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a un biomolécula diana extracelular y (ii) un de-inmunizado, polipéptido toxina Shiga efector que comprende un motivo alterado furina-escisión. En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular y (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado que comprende (a) un fragmento de toxina Shiga A1 región derivada que tiene un extremo carboxi terminal, (b) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1, y (c) al menos un epítipo de células T CD4 + y/o células CD4 + endógenas, alteradas y/o región del epítipo. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función del ribosoma, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: entrar en una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis y/o causar la muerte celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una citotoxicidad comparable o mejor que una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto para todos sus componentes de polipéptido efector de toxina Shiga comprenden un sitio de escisión por furina de toxina Shiga de tipo salvaje en el extremo carboxilo de su región de fragmento A1.

[0105] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación, relativa a una Subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, en la región del epítipo de células B y/o células T seleccionada del grupo de Regiones de la subunidad A de la toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y 210-218 de SEQ ID NO: 3; 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4-33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 34-78 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 77-103 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 128-168 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 160-183 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 236-258 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 274-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, no hay alteración, que es un truncamiento carboxi-terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos un epítipo y/o epítipo de células B y/o células T endógenas, alterados.

[0106] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una Subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, alterando la mutación al menos un residuo de aminoácido en una región situada de forma nativa en 248-251 de la Subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o en 247-250 de la Subunidad A de la toxina similar a Shiga (SEQ ID NO: 3); o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, en un sitio de escisión por furina mínimo del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, el sitio de escisión por furina mínimo está representado por la secuencia de aminoácidos consenso R/Y-x-x-R y/o R-x-x-R.

[0107] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, la molécula de reconocimiento celular comprende un resto molecular situado en carboxi terminal del extremo carboxilo terminal de la región del fragmento A1 de toxina Shiga.

[0108] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, la región de unión cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1.

[0109] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende la región de unión.

[0110] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión y/o un resto molecular situado carboxi terminal del extremo carboxi terminal de la región de fragmento A1 de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la masa de la región de unión y/o resto molecular es al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más.

[0111] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, la molécula de reconocimiento celular comprende una región de unión con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento (por ejemplo, citotoxicidad y/o enrutamiento intracelular).

[0112] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, la región de unión está comprendida dentro de un resto molecular relativamente grande que comprende, por ejemplo, un resto molecular con una masa de al menos 4.5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicado en el presente documento.

[0113] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, el motivo de escisión por furina alterado comprende una sustitución de residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina con respecto a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina por un residuo de aminoácido no cargado positivamente seleccionado del grupo que consiste en: alanina, glicina, prolina, serina, treonina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, triptófano y tirosina. En ciertas realizaciones, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina por una histidina.

65

[0114] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 6, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad comparable a la citotoxicidad de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una duodécima molécula de reconocimiento celular que consiste en la célula molécula dirigida, excepto por todos sus componentes polipeptídicos efectores de la toxina Shiga, cada uno comprende un fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje y/o un sitio de escisión por furina de la toxina Shiga de tipo salvaje en el extremo carboxilo de su región de fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz cuando se introduce en células que exhiben citotoxicidad que está en un rango de 0,1 veces, 0,5 veces o 0,75 veces a 1,2 veces, 1,5 veces, 1.75 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces la citotoxicidad exhibida por la duodécima molécula de reconocimiento celular.

[0115] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en un cordado, de exhibir una tolerabilidad mejorada in vivo en comparación con la tolerabilidad in vivo de la duodécima molécula de reconocimiento celular.

[0116] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 4, la molécula de reconocimiento celular se desinmuniza debido a la alteración del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz de exhibir menos antigenicidad relativa y/o inmunogenicidad relativa en comparación con una molécula de reconocimiento celular de referencia que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto que el motivo de escisión por furina es de tipo salvaje y/o todos los componentes del polipéptido efector de la toxina Shiga consisten en un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, la duodécima molécula de reconocimiento celular.

Conjunto de realizaciones # 7 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi-terminal y un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado

[0117] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, cada una que comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a un biomolécula diana extracelular; (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado y (iii) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal. En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular; (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado que comprende al menos un epítipo y/o epítipo de células T CD4 + y/o células T CD4+, endógenos, y (iii) una retención de retículo endoplásmico carboxi terminal/Motivo de la señal de recuperación de un miembro de la familia KDEL. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibiendo un función del ribosoma, que inactiva enzimáticamente un ribosoma, provoca citostasis y/o provoca citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: entrar en una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis y/o causar la muerte celular.

[0118] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 7, el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal se selecciona del grupo que consiste en: KDEL, HDEF, HDEL, RDEF, RDEL, WDEL, YDEL, HEEF, HEEL, KEEL, CARRETE, KAEL, KCEL, KFEL, KGEL, KHEL, KLEL, RODILLA, KQEL, KREL, KSEL, KVEL, KWEL, KYEL, KEDL, KIEL, DKEL, FDEL, KDEF, KKEL, HADL, HAEL, HIEL, HNEL, HTEL, KTEL, HVEL, NDEL, QDEL, REDL, RNEL, RTDL, RTEL, SDEL, TDEL, SKEL, STEL y EDEL.

[0119] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 7, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación, relativa a una Subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, en la región del epítipo de células B y/o células T seleccionada del grupo de regiones de la subunidad A de la toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y 210-218 de SEQ ID NO: 3; 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4-33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 34-78 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 77-103 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 128-168 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 160-183 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 236-258 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 274-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, no hay alteración que sea un truncamiento carboxi-terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos un epítipo y/o región de epítopos de células B y/o células T endógenas alteradas.

[0120] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 7, la molécula de reconocimiento celular de la

presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad que es mayor que la de una decimotercera molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto porque no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de la familia KDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más citotoxicidad en comparación con la decimotercera molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la decimotercera molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana, tal como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>.

[0121] Para ciertas realizaciones adicionales del conjunto de realizaciones # 7, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxica y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplasmático y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, la decimotercera molécula de reconocimiento celular.

Conjunto de realizaciones # 8 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado en o cerca de un extremo amino terminal de la molécula de reconocimiento celular

[0122] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, comprendiendo cada una (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a un biomolécula diana extracelular, (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado; en donde el polipéptido efector de toxina Shiga está en o cerca de un extremo amino terminal. En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular; (ii) componente polipeptídico; y (iii) un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado que comprende al menos un epítipo y/o región de epítipo de células B y/o células T CD4+ endógeno alterado; en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga está en o cerca de un extremo amino terminal del componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están físicamente dispuestos u orientados dentro de la molécula de reconocimiento celular de manera que la región de unión no se encuentra proximal al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se localiza dentro de la molécula de reconocimiento celular más próxima al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga que al extremo amino terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no está situada proximal a un extremo amino terminal de la molécula de reconocimiento celular en relación con el polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibir una función ribosómica, inactivar enzimáticamente un ribosoma, provocar citostasis y/o provocar citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: entrar en una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis y/o causar la muerte celular.

[0123] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 8, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una mutación, relativa a una Subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, en la región del epítipo de células B y/o células T seleccionada del grupo de regiones de la subunidad A de la toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y 210-218 de SEQ ID NO: 3; 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4-33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 34-78 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 77-103 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 128-168 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 160-183 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 236-258 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 274-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, no hay alteración que sea un truncamiento carboxi-terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos un epítipo y/o región de epítipo de células B y/o células T alterado endógeno.

[0124] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 8, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad que es mayor que la de una decimocuarta molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino y que comprende la región de unión y la región del polipéptido efector de la toxina Shiga que no está posicionada próxima o en el extremo amino de la decimocuarta molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica

mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más de citotoxicidad en comparación con la decimocuarta molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención con respecto a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la decimocuarta molécula de reconocimiento celular con respecto a una segunda población de células positivas diana como se analiza por los valores de  $CD_{50}$ .

[0125] Para ciertas realizaciones adicionales del conjunto de realizaciones # 8, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxica y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplasmático y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, como, por ejemplo, la decimocuarta molécula de reconocimiento celular.

Conjunto de realizaciones # 9 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplásmico carboxi terminal y un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado

[0126] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, comprendiendo cada una (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular; (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado; y (iii) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal. La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, comprendiendo cada una (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular; (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado; y (iii) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de un miembro de la familia KDEL. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibir una función ribosómica, inactivar enzimáticamente un ribosoma, provocar citostasis y/o provocar citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: entrar en una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis y/o causar la muerte celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una citotoxicidad comparable o mejor que una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto para todos sus componentes de polipéptido efector de toxina Shiga comprenden un sitio de escisión por furina de toxina Shiga de tipo salvaje en el extremo carboxilo de su región de fragmento A1.

[0127] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una Subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, alterando la mutación al menos un residuo de aminoácido en una región situada de forma nativa en 248-251 de la Subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o en 247-250 de la Subunidad A de la toxina similar a Shiga (SEQ ID NO: 3); o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, en un sitio de escisión por furina mínimo del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, el sitio de escisión por furina mínimo está representado por la secuencia de aminoácidos consenso R/Y-x-x-R y/o R-x-x-R.

[0128] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, la molécula de reconocimiento celular comprende un resto molecular situado en carboxi terminal del extremo carboxilo de la región del fragmento A1 de toxina Shiga.

[0129] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, la región de unión cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1.

[0130] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende la región de unión.

[0131] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión y/o un resto molecular situado en el extremo carboxilo terminal del carboxilo terminal de la región del fragmento A1 de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la masa de la región de unión y/o resto molecular es al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más.

[0132] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, la molécula de reconocimiento celular comprende una región de unión con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel

apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento (por ejemplo, citotoxicidad y/o enrutamiento intracelular).

5 [0133] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, la región de unión está comprendida dentro de un resto molecular relativamente grande que comprende, por ejemplo, un resto molecular con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento.

10 [0134] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, el motivo de escisión por furina alterado comprende una sustitución de residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina por un residuo de aminoácido no cargado positivamente seleccionado del grupo que consiste en: alanina, prolina, serina, treonina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, triptófano y tirosina. En ciertas realizaciones, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina por una histidina.

20 [0135] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad que es mayor que la de una decimoquinta molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto porque no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de la familia KDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más citotoxicidad en comparación con la decimoquinta molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la decimoquinta molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana, tal como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>.

30 [0136] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en un cordado, de exhibir una tolerabilidad mejorada in vivo en comparación con la tolerabilidad in vivo de una decimosexta molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular a excepción de todos sus componentes polipeptídicos efectores de la toxina Shiga, que comprende cada uno un fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje y/o un sitio de escisión por furina de la toxina Shiga de tipo salvaje en el extremo carboxilo de su región del fragmento A1.

40 [0137] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 9, la molécula de reconocimiento celular se desinmuniza debido a la alteración del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz de exhibir menos antigenicidad relativa y/o inmunogenicidad relativa en comparación con una molécula de reconocimiento celular de referencia que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto que el motivo de escisión por furina es de tipo salvaje y/o todos los componentes del polipéptido efector de la toxina Shiga consisten en un fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, la decimosexta molécula de reconocimiento celular.

45 [0138] Para ciertas realizaciones adicionales del conjunto de realizaciones # 9, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxica y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplasmático y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, la decimoquinta molécula de reconocimiento celular.

Conjunto de realizaciones # 10 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión por furina en o cerca de un extremo amino terminal de la molécula de reconocimiento celular

55 [0139] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, comprendiendo cada una (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular y (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de su región de fragmento de toxina Shiga A1; en donde el extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga está en y/o cerca de un extremo amino de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular, (ii) un polipéptido efector de toxina Shiga que tiene un extremo amino y una región derivada de fragmento de toxina Shiga A1 que tiene un extremo carboxi terminal y (iii) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1; en donde la región de unión no está ubicada proximal al extremo amino terminal de la molécula de

- reconocimiento celular con respecto al polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están físicamente dispuestos u orientados dentro de la molécula de reconocimiento celular de manera que la región de unión no se encuentra proximal al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se localiza dentro de la molécula de reconocimiento celular más próxima al extremo carboxi del polipéptido efector de la toxina Shiga que al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no está situada proximal a un extremo amino de la molécula de reconocimiento celular en relación con el polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibir una función ribosómica, inactivar enzimáticamente un ribosoma, provocar citostasis y/o provocar citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: entrar en una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis y/o causar la muerte celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en las células, de presentar una citotoxicidad comparable o mejor que una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una decimoséptima molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto que todos sus componentes de polipéptido efector de toxina Shiga comprenden un sitio de escisión por furina de toxina Shiga de tipo salvaje en el extremo carboxilo de su región de fragmento A1.
- [0140] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una Subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, alterando la mutación al menos un residuo de aminoácido en una región situada de forma nativa en 248-251 de la Subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o en 247-250 de la Subunidad A de la toxina similar a Shiga (SEQ ID NO: 3); o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, en un sitio de escisión por furina mínimo del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, el sitio de escisión por furina mínimo está representado por la secuencia de aminoácidos consenso R/Y-x-x-R y/o R-x-x-R.
- [0141] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, la molécula de reconocimiento celular comprende un resto molecular situado en el extremo carboxilo terminal del carboxilo terminal de la región del fragmento A1 de toxina Shiga.
- [0142] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, la región de unión cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1.
- [0143] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, el resto molecular cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende la región de unión.
- [0144] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión y/o un resto molecular situado carboxi terminal al extremo carboxi terminal de la región del fragmento de toxina Shiga A1. En ciertas realizaciones adicionales, la masa de la región de unión y/o resto molecular es al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más.
- [0145] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, la molécula de reconocimiento celular comprende una región de unión con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento (por ejemplo, citotoxicidad y/o enrutamiento intracelular).
- [0146] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, la región de unión está comprendida dentro de un resto molecular relativamente grande que comprende, por ejemplo, un resto molecular con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento.
- [0147] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, el motivo de escisión por furina alterado comprende una sustitución de residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina en relación con la Subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina por un residuo de aminoácido no cargado positivamente seleccionado del grupo que consiste en: alanina, glicina, prolina, serina, treonina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, valina, fenilalanina, triptófano y tirosina. En ciertas realizaciones, la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de



un residuo de arginina por una histidina.

[0148] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad que es mayor que la de una décimo octava molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino terminal y que comprende la región de unión y la región del polipéptido efector de la toxina Shiga que no está situada en el extremo amino de la decimotava molécula de reconocimiento celular o en su proximidad. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más citotoxicidad en comparación con la décimo octava molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la décimo octava molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana, tal como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>.

[0149] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, la molécula de reconocimiento celular es capaz, cuando se introduce en un cordado, de exhibir una tolerabilidad mejorada in vivo en comparación con la tolerabilidad in vivo de una molécula de reconocimiento celular decimonovena que consiste en la molécula de reconocimiento celular a excepción de todos sus componentes polipeptídicos efectores de la toxina Shiga, cada uno comprende un fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje y/o un sitio de escisión por furina de la toxina Shiga de tipo salvaje en el extremo carboxilo de su región del fragmento A1.

[0150] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 10, la molécula de reconocimiento celular se desinmuniza debido a la alteración del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular es capaz de exhibir menos antigenicidad relativa y/o inmunogenicidad relativa en comparación con una molécula de reconocimiento celular de referencia que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto que el motivo de escisión por furina es de tipo salvaje y/o todos los componentes del polipéptido efector de la toxina Shiga consisten en un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, la molécula de reconocimiento celular decimonovena.

[0151] Para ciertas realizaciones adicionales del conjunto de realizaciones # 10, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxica y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplasmático y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, la molécula de reconocimiento celular decimonovena.

Conjunto de realizaciones # 11 - Molécula de reconocimiento celular que comprende un motivo señal de retención/recuperación de retículo endoplasmático carboxi terminal y polipéptido efector de toxina Shiga en o cerca de un extremo amino terminal de la molécula de reconocimiento celular

[0152] La presente invención proporciona moléculas de reconocimiento celular, cada una comprendiendo (i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular, (ii) un motivo señal de recuperación/retención del retículo endoplásmico carboxi terminal, y (iii) un polipéptido efector de toxina Shiga; en las que el extremo amino terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga está en y/o es cerca de un extremo amino terminal de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una (i) región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular, (ii) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL, (iii) un componente polipeptídico, y (iv) un polipéptido efector de toxina Shiga; en la que el extremo amino terminal del polipéptido efector de toxina Shiga está en y/o es cerca de un extremo amino terminal de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están físicamente dispuestos u orientados dentro de la molécula de reconocimiento celular de modo que la región de unión no se encuentra próxima del extremo amino terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se localiza dentro de la molécula de reconocimiento celular más próxima al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga que al extremo amino terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no está situada próxima a un extremo amino terminal de la molécula de reconocimiento celular en relación con el polipéptido efector de la toxina Shiga.

[0153] Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir al menos una función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, dirigir el enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o el citosol de una célula en la que está presente el polipéptido, inhibir la función ribosómica, inactivar enzimáticamente un ribosoma, causar citostasis y/o causar citotoxicidad. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de uno o más de los siguientes: entrar en una célula, inhibir una función ribosómica, causar citostasis y/o causar la muerte celular.

[0154] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 11, el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal se selecciona del grupo que consiste en: KDEL, HDEF, HDEL, RDEF, RDEL, WDEL, YDEL, HEEF, HEEL, KEEL, CARRETE, KAEL, KCEL, KFEL, KGEL, KHEL, KLEL, RODILLA, KQEL, KREL, KSEL, KVEL, KWEL, KYEL, KEDL, KIEL, DKEL, FDEL, KDEF, KKEL, HADL, HAEL, HIEL, HNEL, HTEL, KTEL, HVEL, NDEL, QDEL, REDL, RNEL, RTDL, RTEL, SDEL, TDEL, SKEL, STEL y EDEL.

[0155] En ciertas realizaciones del conjunto de realizaciones # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir citotoxicidad que es mayor que la de una vigésima molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino terminal y que comprende la región de unión y la región del polipéptido efector de la toxina Shiga que no está situada en o cerca del extremo amino terminal de la vigésima molécula de reconocimiento celular y/o mayor que la de una vigésima primera molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular a excepción de que no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxilo terminal de la familia KDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la vigésima molécula de reconocimiento celular no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal de la familia KDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más citotoxicidad en comparación con una molécula de referencia, como, por ejemplo, la vigésima y/o vigésima primera molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más que la citotoxicidad de las moléculas de reconocimiento celular vigésimo y/o vigésimo primera a una segunda población de células positivas diana, tal como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>.

[0156] Para ciertas realizaciones adicionales del conjunto de realizaciones # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxica y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplasmático y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, las vigésima y/o vigésima primera molécula de reconocimiento celular.

#### Realizaciones adicionales de conjuntos de realizaciones # 1- # 11

[0157] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga se fusiona a la región de unión, directa o indirectamente, tal como, por ejemplo, a través de un enlazador conocido por el experto en la materia.

[0158] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular comprende un resto molecular situado carboxi terminal del extremo carboxilo terminal de la región del fragmento A1 de la toxina Shiga.

[0159] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de la toxina Shiga tiene una región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y además comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1.

[0160] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o un componente polipeptídico de la misma, comprende un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal de un miembro de la familia KDEL. Para ciertas realizaciones adicionales, el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal se selecciona del grupo que consiste en: KDEL, HDEF, HDEL, RDEF, RDEL, WDEL, YDEL, HEEF, HEEL, KEEL, REEL, KAEL, KCEL, KFEL, KGEL, KHEL, KLEL, KNEL, KQEL, KREL, KSEL, KVEL, KWEL, KYEL, KEDL, KIEL, DKEL, FDEL, KDEF, KKEL, HADL, HAEL, HIEL, HNEL, HTEL, KTEL, HVEL, NDEL, QDEL, REDL, RNEL, RTDL, RTEL, SDEL, TDEL, SKEL, STEL y EDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en células, de exhibir una citotoxicidad que es mayor que la de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una vigésimo segunda molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, a excepción de que no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal de la familia KDEL. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir una citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o más citotoxicidad en comparación con una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, la vigésima segunda molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la vigésima segunda molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana, tal como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>.

[0161] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende además al menos un epítipo heterólogo insertado o integrado.

5 [0162] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende además al menos una, dos, o tres regiones epitópicas de células B y/o células CD4 + endógenas alteradas. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende una alteración de al menos uno, dos o tres epítipos y/o epítipos endógenos de células B y/o células T. En ciertas formas de realización adicionales, el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende además al menos una región epitópica de células T CD4 + y/o células T CD4 + alteradas, que no se solapa con al menos un epítipo heterólogo insertado o integrado.

10 [0163] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el extremo amino terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga está en y/o cerca de un extremo amino terminal de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no está situada cerca del extremo amino terminal de la molécula de reconocimiento celular en relación con el polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga están físicamente dispuestos u orientados dentro de la molécula de reconocimiento celular de modo que la región de unión no se encuentra cerca del extremo amino terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se localiza dentro de la molécula de reconocimiento celular más próxima al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga que al extremo amino terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no es citotóxica y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplásmico y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una vigésima tercera molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino terminal y que comprende la región de unión y el polipéptido efector de toxina Shiga que no está situado en o cerca del extremo amino terminal de la tercera molécula de reconocimiento celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención exhibe citotoxicidad con una potencia citotóxica mejor optimizada, tal como, por ejemplo, una citotoxicidad 4 veces, 5 veces, 6 veces, 9 veces o mayor en comparación con la citotoxicidad de la vigésima tercera molécula de reconocimiento celular. Para ciertas realizaciones adicionales, la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una población de células positivas diana es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o mayor que la citotoxicidad de la vigésima tercera molécula de reconocimiento celular a una segunda población de células positivas diana, tal como se analiza por los valores de CD<sub>50</sub>. En ciertas realizaciones adicionales, la vigésima tercera molécula de reconocimiento celular no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal de la familia KDEL.

15 [0164] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende además una alteración en la región del epítipo de células B y/o células T seleccionada del grupo de regiones de subunidad A de toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y 210-218 de SEQ ID NO: 3; 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4-33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 34-78 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 77-103 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 128-168 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 160-183 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 236-258 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 274-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, no hay alteración que sea un truncamiento carboxi-terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos un epítipo y/o región de epítipo de células B y/o células T endógenas alteradas.

20 [0165] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende además una mutación, relativa a una Subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, en el residuo de aminoácido inmunogénico de células B seleccionado del grupo de residuos de aminoácidos de la subunidad A de la toxina Shiga situados de forma nativa: L49, D197, D198, R204 y R205.

25 [0166] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el epítipo de células T heterólogo integrado o insertado altera la región del epítipo de células B y/o de células T endógena y se selecciona del grupo de Shiga posicionado de forma nativa regiones de subunidad de toxina A que consisten en: (i) 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; y 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en la que no hay alteración, que es un truncamiento amino-terminal de secuencias que se superponen con parte o la totalidad de al menos una

región de epítipo alterada; (ii) 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 210-218 de SEQ ID NO: 3; y (iii) 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma.

[0167] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende una mutación, relativa a una Subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, en la región del epítipo de células B y/o células T seleccionadas de el grupo de regiones de la subunidad A de la toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en: (i) 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; y 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en la que no hay alteración, que es un truncamiento amino-terminal de secuencias que se superponen con parte o la totalidad de al menos una región de epítipo alterada; (ii) 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 210-218 de SEQ ID NO: 3; y (iii) 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en la que no hay alteración, que es un truncamiento amino-terminal de secuencias que se superponen con parte o la totalidad de al menos una región de epítipo alterada.

[0168] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende una alteración de al menos una región epítipo endógena seleccionada del grupo de Subunidades A de toxina Shiga A situadas de forma nativa que consisten en: 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o 210-218 de SEQ ID NO: 3.

[0169] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga no comprende un epítipo de células T heterólogo, restringido a MHC de clase I. Los epítopos de células T restringidos a MHC de clase I son conocidos en la técnica o pueden ser pronosticados por un experto en la materia. El término heterólogo se refiere a epítopos de células T restringidos por MHC clase I que no están presentes de forma nativa en las subunidades de la toxina Shiga A de tipo salvaje, como, por ejemplo, la subunidad de la toxina A Shiga de tipo salvaje que está más estrechamente relacionada con la Shiga polipéptido efector de toxinas de interés.

[0170] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende alteraciones de al menos cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más regiones epítipo de células B y/o células T endógenas.

[0171] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, una o más alteraciones comprenden una sustitución de residuo de aminoácido con respecto a una Subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje.

[0172] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, una o más regiones de epítipo de células B y/o células T endógenas comprende una pluralidad de sustituciones de residuos de aminoácidos en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje.

[0173] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, al menos una, dos, tres o cuatro alteraciones comprenden una pluralidad de sustituciones de residuos de aminoácidos en la región del epítipo de células B y/o de células T endógena en relación a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje.

[0174] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, al menos una alteración comprende al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más sustituciones de residuos de aminoácidos en relación con un tipo salvaje Subunidad A de toxina Shiga, y opcionalmente en la que se produce al menos una sustitución en el residuo de aminoácido de subunidad A de toxina Shiga colocado de forma nativa seleccionado del grupo que consiste en: 1 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 6 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 12 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 44 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 46 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 50 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 51 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 54 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 56 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 57 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3.

3; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 84 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 88 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 104 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 105 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 107 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 108 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 111 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 154 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 185 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 197 de la SEQ ID NO: 3; 198 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 248 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de SEQ ID NO: 3; 251 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o el residuo de aminoácido equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, al menos dos alteraciones comprenden cada una al menos un sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje seleccionada del grupo que consiste en: 1 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 185 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 250 de SEQ ID NO: 3; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o el residuo de aminoácido equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma.

[0175] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende la alteración de al menos tres regiones de epítipo endógeno, de células B y/o de células T seleccionadas del grupo que consiste en: (i) 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; y 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3, o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en donde no hay alteración que es un truncamiento amino terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos una región epitópica de células B y/o células T alteradas, endógenas; (ii) 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 210-218 de SEQ ID NO: 3; y (iii) 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma, en donde no hay alteración, que es un truncamiento carboxi-terminal de residuos de aminoácidos que se superponen con parte o la totalidad de al menos una célula B y/o endógena alterada. Epítipo de células T y/o región del epítipo.

[0176] En ciertas realizaciones de los Conjuntos de realizaciones N° 2 a N° 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende alteraciones de al menos dos regiones epítipos endógenas, de células B y/o de células T, en las que cada alteración comprende uno o más aminoácidos sustituciones de residuos, y en donde las regiones de epítipo endógeno, de células B y/o de células T se seleccionan del grupo de regiones de subunidad A de toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en: 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; o la región equivalente en una subunidad A de toxina Shiga o derivado de la misma.

[0177] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el epítipo de células T heterólogo, integrado o insertado, no interrumpe ninguna región de epítipo endógeno, de células B y/o de células T CD4 + descrita en este documento.

[0178] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, al menos una alteración comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a una Subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje Se selecciona del grupo que consiste en: D a A, D a G, D a V, D a L, D a I, D a F, D a S, D a Q, D a M, D a R, E a A, E a G, E a V, E a L, E a I, E a F, E a S, E a Q, E a N, E a D, E a M, E a R, F a A, F a G, F a V, F a L, F a I, G a A, G a P, H a A, H a G, H a V, H a L, H a I, H a F, H a M, I a A, I a V, I a G, I a C, K a A, K a G, K a V, K a L, K a I, K a M, K a H, L a A, L a V, L a G, L a C, N a A, N a G, N a V, N a L, N a I, N a F, P a A, P a G, P a F, R a A, R a G, R a V, R a L, R a I, R a F, R a M, R a Q, R a S, R a K, R a H, S a A, S a G, S a V, S a L, S a I, S a F, S a M, T a A, T a G, T a V, T a L, T a I, T a F, T a M, T a S, V a A, V a G, Y a A, Y a G, Y a V, Y a L, Y a I, Y a F, Y a M e Y a T. I En ciertas realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de residuos de aminoácidos en relación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje se selecciona del grupo que consiste en: D a A, D a G, D a V, D a L, D a I, D a F, D a S, D a Q, E a A, E a G, E a V, E a L, E a I, E a F, E a S, E a Q, E a N, E a D, E a M, E a R, G a A, H a A, H a G, H a V, H a L, H a I, H a F, H a M, K a A, K a G, K a V, K a L, K a I, K a M, K a H, L a A, L a G, N a A, N a G, N a V, N a L, N a I, N a F, P a A, P a G, P a F, R a A, R a G, R a V, R a L, R a I, R a F, R a M, R a Q, R a S, R a K, R a H, S a A, S a G, S a V, S a L, S a I, S a F, S a M, T a A, T a G, T a V, T a L, T a I, T a F, T a M, T a S, Y a A, Y a G, Y a V, Y a L, Y a I, Y a F e Y a M.

[0179] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, al menos una de las alteraciones comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a una Subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje seleccionada del grupo que consiste en: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; D6 a A, G, V, L, I, F, S, Q y R; S8 a A, G, V, I, L, F y M; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; T12 a A, G, V, I, L, F, M, S y K; S12 a A, G, V, I, L, F y M; S33 a A, G, V, L, I, F, M y C; S43 a A, G, V, L, I, F y M; G44 a A o L; S45 a A, G, V, L, I, F y M; T45 a A, G, V, L, I, F y M; G46 a A y P; D47 a A, G, V, L, I, F, S, M y Q; N48 a A, G, V, L, M y F; L49 a A, V, C y G; Y49 a A, G, V, L, I, F, M y T; F50 a A, G, V, L, I y T; A51 a V; D53 a A, G, V, L, I, F, S y Q; V54 a A, G, I y L; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; G56 a A y P; 157 a A, G, V y M; L57 a A, V, C, G, M y F; D58 a A, G, V, L, I, F, S y Q; P59 a A, G y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, T y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; R84 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; V88 a A y G; 188 a A, V, C y G; D94 a A, G, V, L, I, F, S y Q; S96 a A, G, V, I, L, F y M; T104 a A, G, V, L, I, F, M; y N; A105 a L; T107 a A, G, V, L, I, F, M y P; S107 a A, G, V, L, I, F, M y P; L108 a A, V, C y G; S109 a A, G, V, I, L, F y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D111 a A, G, V, L, I, F, S, Q y T; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D141 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G147 a A; V154 a A y G. R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S y Q; L185 a A, G, V y C; S186 a A, G, V, I, L, F y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S189 a A, G, V, I, L, F y M; D197 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D198 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

[0180] Para ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en un cordado, de exhibir una tolerabilidad y/o estabilidad in vivo mejorada en comparación con una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una vigésima cuarta molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, excepto por todos sus componentes polipeptídicos efectores de la toxina Shiga, cada uno de los cuales comprende un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje y/o la furina de la toxina Shiga de tipo salvaje sitio de escisión en el extremo carboxi terminal de su región de fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga no es citotóxico y el resto molecular es citotóxico.

[0181] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión y el polipéptido efector de toxina Shiga están unidos entre sí, ya sea directa o indirectamente.

[0182] En ciertas realizaciones de los Conjuntos de realizaciones N° 2 a N° 11, la región de unión comprende al menos un péptido y/o polipéptido. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión es o comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: un dominio V<sub>H</sub> autónomo, fragmento de anticuerpo de dominio único (sdAb), nanocuerpo, dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un camélido (V<sub>H</sub>H o V Fragmento de dominio H), dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un pez cartilaginoso (fragmento de dominio V<sub>H</sub>H o V<sub>H</sub>), nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento V<sub>NAR</sub>, fragmento variable de cadena sencilla (scFv), fragmento variable de anticuerpo (Fv), fragmento determinante complementario de la región 3 (CDR3), polipéptido FR3-CDR3-FR4 restringido (FR3-CDR3-FR4), fragmento Fd, dominio inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP), fragmento de unión a antígeno (Fab), polipéptido de repetición de armadillo (ArmRP), fibronectina-deriva 10° dominio de fibronectina de tipo III (10Fn3), tenascina tipo III de dominio (TNfn3), dominio motivo de repetición de anquirina, lipoproteína-receptor derivado de baja densidad A-dominio (LDLR-A), lipocalina (anticalina), dominio Kunitz, dominio Z derivado de proteína A, gamma-B cr dominio derivado de isstallina, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d (affitin), dominio SH2 derivado de Fyn, miniproteína, andamiaje de dominio tipo lectina tipo C, imitación de anticuerpos modificados genéticamente y

cualquier homólogo manipulado genéticamente de cualquiera de los anteriores que conserve la funcionalidad de unión.

5 [0183] Para ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de exhibir (i) un nivel de actividad catalítica comparable a un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje o Shiga de tipo salvaje polipéptido toxina efector, (ii) un ribosoma inhibición de la actividad con un valor de concentración inhibitoria semimáxima (IC<sub>50</sub>) de 10 000 picomolar o menos, y/o (iii) un nivel significativo de la actividad catalítica de la toxina Shiga.

10 [0184] Para ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención y/o su polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir una eficiencia de enrutamiento subcelular comparable a una molécula de reconocimiento celular de referencia que comprende un salvaje fragmento de toxina Shiga A1 de tipo o polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje y/o capaz de exhibir un nivel significativo de actividad de enrutamiento intracelular al retículo endoplásmico y/o citosol desde una  
15 ubicación de inicio endosomal de una célula.

[0185] Para ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, mediante los cuales la administración de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una célula físicamente acoplada con la biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular, la orientación de la  
20 célula La molécula es capaz de causar la muerte de la célula. En ciertas realizaciones adicionales, la administración de la molécula de reconocimiento celular de la invención a dos poblaciones diferentes de tipos de células que difieren con respecto a la presencia o nivel de la biomolécula objetivo extracelular, la molécula de reconocimiento celular es capaz de causar la muerte celular a la célula. tipos de células acoplados físicamente con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular citotóxica en un CD<sub>50</sub> al menos  
25 tres veces o menos que el CD<sub>50</sub> a tipos de células que no están acoplados físicamente con una biomolécula diana extracelular de la célula región de unión de la molécula dirigida. Para ciertas realizaciones, mediante las cuales la administración de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una primera población de células cuyos miembros están físicamente acoplados a biomoléculas diana extracelulares de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular, y una segunda población de células cuyos miembros no son acoplado físicamente a cualquier biomolécula diana extracelular de la región de unión, el efecto citotóxico de la molécula de  
30 reconocimiento celular a los miembros de dicha primera población de células con respecto a los miembros de dicha segunda población de células es al menos 3 veces mayor. Para ciertas realizaciones, mediante las cuales la administración de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una primera población de células cuyos miembros están físicamente acoplados a una cantidad significativa de la biomolécula objetivo extracelular de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular, y una segunda población de células cuyos miembros no están físicamente acoplados a una cantidad significativa de ninguna biomolécula diana extracelular de la región de unión, el efecto citotóxico de la molécula de reconocimiento celular 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  
35 ciertas realizaciones, mediante las cuales la administración de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una primera población de células positivas para biomolécula diana, y una segunda población de células cuyos miembros no expresan una cantidad significativa de una biomolécula diana de la molécula de reconocimiento celular región de unión en una superficie celular, el efecto citotóxico de la molécula de reconocimiento celular a 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.

40 [0186] Para ciertas realizaciones de los Conjuntos de realizaciones Nº 2 a Nº 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una citotoxicidad con un valor de concentración inhibitoria semimáxima (CD<sub>50</sub>) de 300 nM o menos y/o capaz de exhibir un nivel significativo de citotoxicidad de toxina Shiga.

50 [0187] Para ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de suministrar un epítipo de células T CD8 + heterólogo, integrado o insertado a una ruta de presentación MHC de clase I de una célula para la presentación en la superficie celular del epítipo unido por una molécula MHC de clase I.

55 [0188] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular comprende un resto molecular asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones, el resto molecular comprende o consiste en la región de unión. En ciertas realizaciones, el resto molecular comprende al menos un aminoácido y el polipéptido efector de toxina Shiga está unido a al menos un residuo de aminoácido del resto molecular. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular y el polipéptido efector de toxina Shiga se fusionan formando un polipéptido continuo.

60 [0189] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular comprende además un resto molecular citotóxico asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de toxina Shiga. Para ciertas realizaciones, el resto molecular citotóxico es un agente citotóxico, tal como, por ejemplo,  
65

un agente quimioterapéutico de molécula pequeña, agente antineoplásico, antibiótico citotóxico, agente alquilante, antimetabolito, inhibidor de topoisomerasa y/o inhibidor de tubulina conocido por el experto. y/o descrito aquí. Para ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular citotóxico es citotóxico a concentraciones inferiores a 10.000, 5.000, 1.000, 500 o 200 pM.

5 [0190] En ciertas realizaciones de los Conjuntos de realizaciones<sup>Nº</sup> 2 a Nº 11, la región de unión es capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en: CD20, CD22, CD40, CD74, CD79, CD25, CD30, HER2/neu/ErbB2, EGFR, EpCAM, EphB2, antígeno de membrana prostático específico, Cripto, CDCP1, endoglina, proteína de activación de fibroblastos, Lewis-Y, CD19, CD21, CS1/SLAMF7, CD33, CD52, 10 CD133, gpA33, mucina, TAG- 72, receptor transmembrana proteína tirosina 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, Erb, ErbB3/EGFR, Erb -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-catenin, MUM-1, caspase-8, KIAA0205, HPVE6, SART-1, PRAME, antígeno 15 carcinoembrionario, antígeno prostático específico, antígeno prostático de células madre, humano aspartilo (asparagina I) beta-hidroxilasa, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART-1/MelanA, gp100, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus Epstein-Barr, Bcr-Abl, antígeno de alfafetoproteína, 17-A1, antígeno tumoral de vejiga, CD38, CD15, CD23, CD45 (receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C), CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, galectina-9, IL-1R (interleucina -1 receptor), mrp-14, ligando 20 NKG2D, ligando de muerte programada 1 (PD-L1), Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, FcεR1a, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, CD11a-c, GITRL, molécula MHC clase I, molécula MHC clase II (opcionalmente complejado con un péptido), CD284 (TLR4), CD107-Mac3, CD195 (CCR5), HLA-DR, CD16/32, CD282 (TLR2), CD11c y cualquier fragmento 25 inmunogénico de cualquiera de los anteriores.

25 [0191] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión está unida, directa o indirectamente, al polipéptido efector de toxina Shiga por al menos un enlace covalente que no es un enlace disulfuro. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión se fusiona, directa o indirectamente, al extremo carboxi terminal del polipéptido efector de toxina Shiga para formar un único polipéptido continuo. En ciertas 30 realizaciones adicionales, la región de unión es una región de unión de tipo inmunoglobulina.

[0192] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones en el sitio mínimo de escisión por furina en relación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado no es un truncamiento 35 amino-terminal de secuencias que se solapan con parte o la totalidad de al menos un residuo de aminoácido del sitio de escisión por furina mínimo. En ciertas realizaciones, la mutación en el sitio mínimo de escisión con furina es una delección, inserción y/o sustitución de aminoácidos de al menos un residuo de aminoácido en el motivo de escisión con furina R/YxxR. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterada comprende al menos una mutación con respecto a una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje, la mutación altera al menos un 40 residuo de aminoácido en la región situada de forma nativa 1) en 248-251 de la A Subunidad de toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o 2) en 247-250 de la Subunidad A de toxina Shiga-like 2 (SEQ ID NO: 3), o la posición de secuencia de aminoácidos equivalente en cualquier subunidad A de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, la mutación es una sustitución de un residuo de aminoácido de un residuo de arginina con un residuo de aminoácido no cargado positivamente.

45 [0193] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz cuando se introduce en células de exhibir citotoxicidad comparable a una citotoxicidad de una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una vigésimo quinta molécula de reconocimiento celular que consiste en la molécula de reconocimiento celular, a excepción de todos sus componentes polipeptídicos 50 efectores de la toxina Shiga, cada uno de los cuales comprende un fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje.

[0194] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión comprende el péptido o polipéptido mostrado en cualquiera de las SEQ ID NO: 83-339. En ciertas realizaciones adicionales, la región de 55 unión comprende o consiste esencialmente en el polipéptido representado por cualquiera de los siguientes: aminoácidos 1-245 de cualquiera de las SEQ ID NO: 33, 64 y 65; 269-513 de SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 80; aminoácidos 269-520 o 269-521 de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 66 y 67; aminoácidos 1-232, 1-233, 1-234, 1-235, 1-236, 1-242, 1-243, 1-244, 1-245, 1-246, 1-252, 1-253, 1-254, 1-255 o 1-256 de cualquiera de las SEQ ID NO: 47-119 y 176-248; aminoácidos 269-498 o 269-499 de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-39, 68-79 y 81; aminoácidos 269-499, 269-512, 269-513 o 280-510 de cualquiera de las SEQ ID NO: 34, 35, 41-56 y 82.

60 [0195] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1.

[0196] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, el resto molecular cubre estéricamente 65 el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1. En ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular



comprende la región de unión.

5 [0197] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión y/o resto molecular situado en el extremo carboxilo terminal del carboxilo de la región del fragmento de toxina Shiga A1. En ciertas realizaciones adicionales, la masa de la región de unión y/o resto molecular es al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más.

10 [0198] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular comprende una región de unión con una masa de al menos 4.5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga indicada en el presente documento (p. Ej., Citotoxicidad y/o enrutamiento intracelular).

15 [0199] En ciertas realizaciones de los Conjuntos de realizaciones<sup>o</sup> 2 a <sup>o</sup> 11, la región de unión está comprendida dentro de un resto molecular relativamente grande que comprende, por ejemplo, un resto molecular con una masa de al menos 4,5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa, 50 kDa, 100 kDa o más, siempre que la molécula de reconocimiento celular conserve el nivel apropiado de la actividad biológica de la toxina Shiga observada Aquí en.

20 [0200] Para ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención exhibe una potencia citotóxica baja (es decir, no es capaz cuando se introduce en ciertos tipos de células diana positivas de exhibir una citotoxicidad mayor del 1% de células muerte de una población celular a una concentración de molécula de reconocimiento celular de 1000 nM, 500nM, 100 nM, 75 nM o 50 nM) y es capaz, cuando se introduce en las células, de exhibir una mayor eficiencia de enrutamiento subcelular desde un espacio extracelular a un compartimento subcelular de un retículo endoplásmico y/o citosol en comparación con la eficiencia de enrutamiento subcelular de una molécula de referencia, como, por ejemplo, una vigésima sexta molécula de reconocimiento celular que tiene un extremo amino y que comprende la región de unión y el polipéptido efector de toxina Shiga que no está posicionado o cerca del extremo amino de la tercera molécula de reconocimiento celular. En ciertas realizaciones adicionales, la vigésima sexta molécula de reconocimiento celular no comprende ningún motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal de la familia KDEL.

35 [0201] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, en ciertas realizaciones adicionales, el resto molecular comprende un péptido y/o polipéptido derivado del fragmento de toxina Shiga A2 de una toxina Shiga natural.

40 [0202] Las realizaciones de la presente invención no están destinadas a cubrir ninguna holotoxina Shiga o subunidad de toxina Shiga de origen natural. En ciertas realizaciones de los Conjuntos de realizaciones<sup>o</sup> 2-11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no comprende una Subunidad de toxina Shiga B de origen natural. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la invención no comprende ningún polipéptido que comprenda o consista esencialmente en un dominio de unión funcional de una subunidad de la toxina B Shiga nativa. Más bien, en ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la invención, las regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga están funcionalmente asociadas con regiones de unión heterólogas para efectuar el direccionamiento de células.

50 [0203] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión no comprende un fragmento de CD4 humano correspondiente a los residuos de aminoácidos 19-183. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no comprende un fragmento de CD4 humano, una glicoproteína transmembrana de tipo I. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión no comprende un fragmento de un correceptor de la superficie celular inmune humana.

55 [0204] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención no comprende una región de unión carboxi-terminal que comprende un fragmento de un receptor de la superficie de la célula inmune.

[0205] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 1 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende al menos dos epítomos heterólogos, integrados o insertados.

60 [0206] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 1 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga no comprende el conjunto de sustituciones de residuos de aminoácidos en relación con una Subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje seleccionada de los siguientes conjuntos: (1) R248H y R251H; (2) R248G y R251G; (3) A246G, S247A, A253G y S254A; y (4) A246G, S247A, R248G, R251G, A253G y S254A.

65 [0207] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 1 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga no

comprende una delección de la región situada de forma nativa en 247-252 en una Subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones de los Conjuntos de realizaciones N° 2-11, el polipéptido efector de toxina Shiga no comprende delecciones de las regiones situadas de forma nativa en 245-247 y 253-255 en una Subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje.

5 [0208] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 1 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende una o más mutaciones en relación con una Subunidad A natural de un miembro de la familia de toxina Shiga que cambia una actividad enzimática del efector de toxina Shiga polipéptido, la mutación seleccionada de al menos una delección, inserción o sustitución de residuos de aminoácidos. En ciertas realizaciones adicionales, la mutación relativa a la Subunidad A que ocurre de forma natural reduce o elimina una actividad citotóxica del polipéptido efector de toxina Shiga pero el polipéptido efector de toxina Shiga retiene al menos otra función efectora de toxina Shiga, tal como, por ejemplo, promover la internalización celular y/o dirigir el enrutamiento intracelular a cierto compartimento (s) subcelular (es). En ciertas realizaciones adicionales, la mutación relativa a la Subunidad A natural 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.

10 [0209] Para ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 1 a # 11, el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de: (i) enrutar a un compartimento subcelular de una célula en la que el polipéptido efector de toxina Shiga está presente seleccionado de entre los siguientes: citosol, retículo endoplásmico y lisosoma; (ii) suministro intracelular del epítipo desde un compartimento endosómico temprano a un proteasoma de una célula en la que está presente el polipéptido efector de la toxina Shiga; y/o (iii) suministro intracelular del epítipo a una molécula MHC de clase I desde un compartimento endosómico temprano de una célula en la que está presente el polipéptido efector de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de administrar intracelularmente el epítipo de células T CD 8+ para su presentación por una molécula MHC de clase I en la superficie de una célula en la que está presente el polipéptido efector de la toxina Shiga.

20 [0210] En ciertas realizaciones, la molécula de la presente invención no comprende, en una posición carboxi-terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga y/o el extremo carboxi terminal de la región del fragmento de la toxina Shiga A1, ningún material exógeno adicional que represente un antígeno y/o heterólogo, CD8 +, epítipo-péptido de células T.

30 [0211] En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión no comprende un ligando. En ciertas realizaciones de los Conjuntos de realizaciones N° 2 a N° 11, la región de unión no comprende una quimiocina o un ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) ni un fragmento de unión a receptor del mismo. En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión no comprende una quimiocina humana o TRAIL humana ni un fragmento de unión a receptor de la misma. En realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión de tipo inmunoglobulina no comprende un ligando ni un fragmento de unión a receptor del mismo. En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión de tipo inmunoglobulina no comprende una quimiocina o un ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) ni un fragmento de unión a receptor de la misma. En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión no comprende una quimiocina CC humana ni un fragmento de unión al receptor de la misma. En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión no comprende la quimiocina CCL2 (véase Bose S, Cho J et al., Arch Pharm Res 36: 1039-50 (2013)). En ciertas realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión no comprende la quimiocina CCL2 CC humana, ni un fragmento de unión al receptor de la misma, y un polipéptido efector de toxina Shiga carboxi-terminal que consiste en los aminoácidos 75-247 de StxA. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión no comprende la quimiocina CCL2 CC humana, ni un fragmento de unión al receptor de la misma, fusionado a un polipéptido efector de la toxina Shiga carboxi terminal que consiste en aminoácidos 75 -247 de StxA (SEQ ID NO: 2). En las realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 2 a # 11, la región de unión no comprende el TRAIL humano ni un fragmento de unión al receptor del mismo.

40 [0212] Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los polipéptidos efectores de toxina Shiga anteriores de la presente invención y/o cualquiera de las moléculas de reconocimiento celular anteriores de la presente invención; y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 [0213] Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra una composición de diagnóstico que comprende cualquiera de las moléculas de reconocimiento celular anteriores de la presente invención y un agente promotor de detección. Ciertas realizaciones adicionales son moléculas de reconocimiento celular de la presente invención en las que el agente promotor de detección es un epítipo heterólogo y la molécula de reconocimiento celular comprende el epítipo heterólogo.

60 [0214] Más allá de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención, las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, y sus composiciones, los polinucleótidos capaces de codificar un

5 polipéptido efector de la toxina Shiga o la molécula de reconocimiento celular de la presente invención están dentro del alcance de la presente invención, así como los vectores de expresión que comprenden un polinucleótido de la presente invención y células huésped que comprenden cualquier polinucleótido y/o vector de expresión de la presente invención. Las células huésped que comprenden un vector de expresión pueden usarse, por ejemplo, en procedimientos para producir una molécula de la presente invención o un componente polipeptídico o fragmento del mismo por expresión recombinante.

10 [0215] Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra un procedimiento para matar una célula que comprende la etapa de poner en contacto la célula con cualquiera de las moléculas de reconocimiento celular anteriores de la presente invención o las composiciones farmacéuticas anteriores de la presente invención. En ciertas realizaciones, el paso de contactar la (s) célula (s) ocurre in vitro. En ciertas otras realizaciones, el paso de contactar la (s) célula (s) ocurre o in vivo. En realizaciones adicionales de los procedimientos de eliminación de células, el procedimiento es capaz de eliminar selectivamente células y/o tipos de células preferentemente sobre otras células y/o tipos de células cuando se pone en contacto con una mezcla de células que difieren con respecto al presencia extracelular y/o nivel de expresión de una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular.

20 [0216] La presente invención proporciona además procedimientos para tratar enfermedades, trastornos y/o afecciones en pacientes que comprenden la etapa de administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de reconocimiento celular y/o composición farmacéutica del presente invención. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno o afección a tratar usando un procedimiento de la invención se selecciona de: un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario o infección microbiana. En ciertas realizaciones de estos procedimientos, el cáncer a tratar se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hematológico, cáncer de riñón-tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel y cáncer uterino. En ciertas realizaciones de estos procedimientos, el trastorno inmunitario a tratar es un trastorno inmunitario asociado con una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: amiloidosis, espondilitis anquilosante, asma, enfermedad de Crohn, diabetes, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, Tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, esclerosis múltiple, poliarteritis nodosa, poliartritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjogren, colitis ulcerosa y vasculitis.

35 [0217] El uso de cualquier composición de materia 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 invención. Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra una molécula de reconocimiento celular de la presente invención y/o una composición farmacéutica de la misma para el tratamiento o prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario y/o infección microbiana. Entre ciertas realizaciones de la presente invención está el uso de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención y/o una composición farmacéutica de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un cáncer, tumor, anomalía de crecimiento, trastorno inmunitario o infección microbiana

45 [0218] Ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden utilizarse para el suministro de material exógeno adicional en una célula acoplada físicamente con una biomolécula objetivo extracelular de la molécula de reconocimiento celular de la invención. Además, la presente invención proporciona un procedimiento para suministrar material exógeno al interior de una (s) célula (s) que comprende poner en contacto la (s) célula (s), in vitro o in vivo, con una molécula de reconocimiento celular, composición farmacéutica y/o diagnóstico composición de la presente invención. La presente invención proporciona además un procedimiento para administrar material exógeno al interior de una (s) célula (s) en un paciente, el procedimiento comprende la etapa de administrar al paciente una molécula de reconocimiento celular de la presente invención (con o sin actividad citotóxica), en donde la (s) célula (s) diana (s) está (n) físicamente acoplada (s) con una biomolécula diana extracelular de la molécula de reconocimiento celular.

55 [0219] Entre ciertas realizaciones de la presente invención, se encuentra un procedimiento para suministrar a una célula un epítipo de células T capaz de ser presentado por una molécula MHC de clase I de la célula, comprendiendo el procedimiento la etapa de poner en contacto la célula con la molécula de reconocimiento celular de la presente invención que está asociada con un epítipo de células T heterólogo y/o una composición del mismo (por ejemplo, una composición farmacéutica o de diagnóstico de la presente invención).

60 [0220] Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra un procedimiento para "sembrar" un locus de tejido dentro de un cordado, el procedimiento comprende la etapa de: administrar al cordado una molécula de reconocimiento celular de la presente invención, una composición farmacéutica de la presente invención, y/o una composición de diagnóstico de la presente invención. En ciertas realizaciones adicionales, los procedimientos de la invención para "sembrar" un locus de tejido son para "sembrar" un locus de tejido que comprende un tejido maligno, enfermo o inflamado. En ciertas realizaciones adicionales, los procedimientos de la invención para "sembrar" un

locus de tejido son para "sembrar" un locus de tejido que comprende el tejido seleccionado del grupo que consiste en: tejido enfermo, masa tumoral, crecimiento canceroso, tumor, tejido infectado, o masa celular anormal. En ciertas realizaciones adicionales, los procedimientos de la invención para "sembrar" un locus de tejido comprenden administrar al cordal la molécula de reconocimiento celular de la invención, la composición farmacéutica de la invención o la composición de diagnóstico de la invención que comprende el heterólogo, T -epítipo de células seleccionado del grupo que consiste en: péptidos no presentados de forma nativa por las células diana de la molécula de reconocimiento celular en complejos de MHC clase I, péptidos no presentes de forma nativa dentro de ninguna proteína expresada por la célula diana, péptidos no presentes de forma nativa dentro del proteoma de la célula diana, los péptidos que no están presentes de forma nativa en el microambiente extracelular del sitio que se va a sembrar, y los péptidos que no están presentes de forma nativa en la masa tumoral o el sitio de tejido infectado a ser dirigido.

[0221] El uso de cualquier composición de materia 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 invención. Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra un procedimiento para usar una molécula de reconocimiento celular de la presente invención que comprende un agente promotor de detección y/o composición de la invención (por ejemplo, una composición de diagnóstico) para la recolección de información útil en el diagnóstico, pronóstico o caracterización de una enfermedad, trastorno o afección. Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra el procedimiento de detección de una célula (o compartimento subcelular de la misma) usando una molécula de reconocimiento celular y/o una composición de diagnóstico de la presente invención, el procedimiento comprende los pasos de poner en contacto una célula con la orientación celular composición de molécula y/o diagnóstico y detección de la presencia de dicha molécula de reconocimiento celular y/o composición de diagnóstico. En ciertas realizaciones, el paso de contactar las células ocurre in vitro. En ciertas realizaciones, la etapa de contactar la (s) célula (s) ocurre in vivo. En ciertas realizaciones, el paso de detectar la (s) célula (s) ocurre in vitro. En ciertas realizaciones, el paso de detectar la (s) célula (s) ocurre in vivo. En ciertas realizaciones adicionales, el procedimiento implica la detección de la ubicación de la molécula de reconocimiento celular en un organismo usando uno o más procedimientos de formación de imágenes después de la administración de la molécula de reconocimiento celular a dicho organismo. Por ejemplo, las moléculas de reconocimiento celular de la invención que incorporan agentes promotores de detección como se describe en el presente documento pueden usarse para caracterizar enfermedades como potencialmente tratables por una composición farmacéutica relacionada de la presente invención. Por ejemplo, ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención y sus composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas y composiciones de diagnóstico de la presente invención), y los procedimientos de la presente invención pueden usarse para determinar si un paciente pertenece a un grupo que responde a una composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención y sus composiciones pueden usarse para identificar células que presentan un péptido epítipo heterólogo sobre una superficie celular y/o para identificar sujetos que contienen células que presentan un péptido epítipo heterólogo administrándolo por una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

[0222] Entre ciertas realizaciones de la presente invención hay un procedimiento para producir una molécula de la presente invención, el procedimiento comprende la etapa de purificar la molécula de la invención o un componente polipeptídico de la misma usando una interacción bacteriana del dominio de la proteína de la pared celular, tal como, por ejemplo, proteína L de P. magnus o derivados y fragmentos de dominio de unión de la misma. En ciertas realizaciones adicionales, la etapa de purificación del procedimiento implica el polipéptido efector de toxina Shiga que comprende o consiste esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID NO: 6-32 y 340-383. En ciertas realizaciones adicionales, la etapa de purificación del procedimiento implica que la molécula de reconocimiento celular comprende o consiste esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID NO: 43-82 y 439-513.

[0223] Ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención pueden utilizarse como inmunógeno o como un componente de un inmunógeno para la inmunización y/o vacunación de un cordado. Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra un procedimiento para inmunizar un cordado usando un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención, comprendiendo el procedimiento administrar un cordal el polipéptido efector de toxina Shiga de la invención. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende o consiste esencialmente en uno cualquiera de los polipéptidos mostrados en las SEQ ID NO: 6-32 y 340-383.

[0224] Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentran kits que comprenden una composición de materia de la invención, y opcionalmente, instrucciones de uso, reactivo (s) adicional (es) y/o dispositivo (s) de suministro farmacéutico (s). El kit puede comprender además reactivos y otras herramientas para detectar un tipo de célula (por ejemplo, una célula tumoral) en una muestra o en un sujeto.

[0225] Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, las reivindicaciones adjuntas y las figuras adjuntas. Los elementos de la invención mencionados anteriormente pueden combinarse individualmente o eliminarse libremente para realizar otras

realizaciones de la invención, sin ninguna declaración de objetar dicha síntesis o eliminación a continuación.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 [0226] La Figura 1 representa ejemplos de polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga de la presente invención (numerados 1-5) y moléculas de reconocimiento celular que comprenden los mismos (por ejemplo, "2/3" denota el polipéptido efector de la toxina Shiga 2 o 3). Las representaciones de moléculas de ejemplo en la Figura 1 son para fines ilustrativos de ciertas disposiciones generales de las características estructurales de un conjunto limitado de realizaciones de la presente invención. Debe entenderse que estas moléculas de ejemplo no pretenden, ni deben interpretarse, ser totalmente definitivas en cuanto a la disposición de cualquier característica estructural y/o componentes de una molécula de la presente invención. El tamaño relativo, la ubicación o el número de características que se muestran en los esquemas de la Figura 1 se han simplificado. Por ejemplo, las posiciones relativas de los epítomos heterólogos integrados y las alteraciones de un epítomo endógeno no son fijas. De manera similar, el número total de epítomos heterólogos integrados y las alteraciones de un epítomo endógeno no son fijos. Ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención comprenden una pluralidad de regiones de epítomo endógenas alteradas en un único polipéptido efector de toxina Shiga, tales como, por ejemplo, alteraciones de cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o más regiones; en donde estas regiones de epítomo alteradas y endógenas pueden distribuirse por todo el polipéptido efector de la toxina Shiga, incluidas las alteraciones que se superponen con el motivo de escisión por furina de la región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga (véase la Tabla 8, infra). Ciertas realizaciones de la presente invención comprenden alteraciones de regiones epítomas endógenas que son carboxi terminales al carboxi terminal del fragmento de toxina Shiga A1, o un derivado del mismo, tal como, por ejemplo, en una posición carboxi terminal a cualquier furina alterada motivo del sitio de escisión. Los esquemas de la figura 1 no pretenden representar con precisión ninguna información con respecto a los tamaños relativos de las estructuras moleculares en ninguna realización de la presente invención.

10 La Figura 2 muestra gráficamente las actividades de inhibición de la síntesis de proteínas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención in vitro y en un intervalo de concentraciones. Para cada molécula de muestra, la intensidad luminiscente de la luciferasa expresada durante el ensayo en unidades luminiscentes relativas (RLU) se trazó sobre el logaritmo hasta la base 10 de la concentración de la molécula de reconocimiento celular probada en picomolar. Estas moléculas de reconocimiento celular de ejemplo exhibieron actividades de inhibición de ribosomas comparables a una molécula de reconocimiento celular "control", cuyo componente polipeptídico efector de toxina Shiga consistía en un fragmento de subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje excepto que comprendía un sitio de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de su región de fragmento de toxina Shiga A1 (SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5)). La Figura 2 muestra que las alteraciones de ejemplo de los polipéptidos de la subunidad A de la toxina Shiga de origen natural, tales como, por ejemplo, las sustituciones de inmunización y los epítomos de células T heterólogos, integrados, no afectaron significativamente la actividad catalítica de la toxina Shiga.

15 Las Figuras 3-7 y 9-10 muestran gráficamente que las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención SLT-1A-combinación (n)::scFv- (n) exhibieron citotoxicidad de reconocimiento celular comparable a las moléculas de control de células SLT "control" -1A-FR::scFv- (n), cuyo componente polipeptídico efector de la toxina Shiga consistía en un fragmento de la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, excepto que comprendía un sitio de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de su toxina Shiga A1 región de fragmento (SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5)). El porcentaje de viabilidad de las células positivas objetivo para cada tipo de célula se trazó sobre el logaritmo hasta la base 10 de la concentración de la molécula de reconocimiento celular administrada a las células respectivas.

20 La Figura 3 muestra gráficamente que la molécula de ejemplo de reconocimiento celular SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44) exhibió citotoxicidad a dos tipos de células diferentes comparables a una molécula de reconocimiento celular "control" SLT-1A -FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34).

25 La Figura 4 muestra gráficamente que la molécula de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44) exhibió citotoxicidad para un tipo de célula diana positiva comparable a una molécula de reconocimiento celular SLT-1A "control" -FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34). La especificidad de la orientación celular se mostró usando el mismo ensayo con una línea celular negativa para la expresión en la superficie celular de una biomolécula diana de scFv-1. En la Figura 4 para la línea celular H, el porcentaje de viabilidad de las células negativas diana se trazó sobre el logaritmo hasta la base 10 de la concentración de la molécula de reconocimiento celular administrada a las células. La Figura 4 muestra que la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44) no exhibió citotoxicidad para un tipo de célula diana negativo a las concentraciones probadas.

30 La Figura 5 muestra gráficamente que las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación10::scFv-1 (SEQ ID NO: 47), SLT-1A-combinación16::scFv-1 (SEQ ID NO: 52) y SLT- 1A-combinación19::scFv-1 (SEQ ID NO: 55) exhibió citotoxicidad a dos tipos de células diferentes comparables a una molécula de control de células SLT-1A-FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34)

35 La Figura 6 muestra gráficamente que la molécula de orientación celular de ejemplo SLT-1A-combinación17::scFv-1 (SEQ ID NO: 53) exhibió citotoxicidad para la línea celular A comparable a una molécula de control celular SLT-1A-FR "control"::scFv-1 (SEQ ID NO: 34); mientras que SLT-1A-combinación17::scFv-1 (SEQ ID NO: 53) exhibió citotoxicidad atenuada a la línea celular B en comparación con el control. La Figura 6 muestra que la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación18::scFv-1 (SEQ ID NO: 54) no exhibió citotoxicidad para ambos tipos

de células probados en concentraciones de hasta 100 nM. También se muestran los resultados de citotoxicidad de este ensayo para un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje no dirigido en lugar de una molécula de reconocimiento celular.

La Figura 7 muestra gráficamente que la molécula de orientación celular de ejemplo SLT-1A-combinación2::scFv-2 (SEQ ID NO: 58) exhibió citotoxicidad para las líneas celulares B y G comparables a una molécula de orientación celular "control" SLT-1A -FR::scFv-2 (SEQ ID NO: 35); mientras que SLT-1A-combinación2::scFv-2 (SEQ ID NO: 58) exhibió citotoxicidad ligeramente atenuada a la línea celular A en comparación con el control. La Figura 7 muestra que la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación13::scFv-2 (SEQ ID NO: 62) exhibió citotoxicidad fuertemente atenuada a los tres tipos de células analizados en comparación con el control.

La Figura 8 muestra gráficamente que las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención scFv-3::SLT-1A-combinación5 (SEQ ID NO: 64) y scFv-3::SLT-1A-combinación6 (SEQ ID NO: 65) citotoxicidad de reconocimiento celular a dos tipos diferentes de células positivas dirigidas comparables a una molécula de reconocimiento celular "control" scFv-3::SLT-1A-WT (SEQ ID NO: 33), cuyo componente de la subunidad A de la toxina Shiga era un componente salvaje -type Shiga toxin A Subunit fragment. El porcentaje de viabilidad de las células positivas objetivo para dos tipos de células diferentes se trazó sobre el logaritmo hasta la base 10 de la concentración de molécula de reconocimiento celular administrada a las células. Para la línea celular B, tanto scFv-3::SLT-1A-combinación5 (SEQ ID NO: 64) como scFv-3::SLT-1A-combinación6 (SEQ ID NO: 65) exhibieron potencia citotóxica según lo medido por  $CD_{50}$  valores menores que un nivel equivalente del control. La especificidad de la orientación celular se mostró usando el mismo ensayo con una línea celular negativa para la expresión en la superficie celular de una biomolécula diana de scFv-3. En la Figura 8 para la línea celular A, el porcentaje de viabilidad de las células negativas diana se trazó sobre el logaritmo hasta la base 10 de la concentración de la molécula de reconocimiento celular administrada a las células. La Figura 8 muestra que las moléculas de reconocimiento celular scFv-3::SLT-1A-combinación5 (SEQ ID NO: 64) y scFv-3::SLT-1A-combinación6 (SEQ ID NO: 65) exhibieron citotoxicidad no dirigida a un objetivo tipo de célula negativa comparable al control.

La Figura 9 muestra gráficamente que las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación7::scFv-4 (SEQ ID NO: 66) y SLT-1A-combinación14::scFv-4 (SEQ ID NO: 67) exhibieron células dirigidas citotoxicidad a un tipo de célula positiva diana comparable a una molécula de control celular "control" SLT-1A-FR::scFv-4 (SEQ ID NO: 36). La especificidad del reconocimiento celular se mostró usando el mismo ensayo con una línea celular negativa para la expresión en la superficie celular de una biomolécula diana de scFv-4. En la Figura 9 para la línea celular E, el porcentaje de viabilidad de las células negativas diana se trazó sobre el logaritmo hasta la base 10 de la concentración de la molécula de reconocimiento celular administrada a las células. La Figura 9 muestra que las moléculas de reconocimiento celular SLT-1A-combinación7::scFv-4 (SEQ ID NO: 66) y SLT-1A-combinación14::scFv-4 (SEQ ID NO: 67) exhibieron citotoxicidad no dirigida a un objetivo tipo de célula negativa comparable al control.

La Figura 10 muestra gráficamente que la molécula de ejemplo de reconocimiento celular SLT-1A-combinación8::scFv-5 (SEQ ID NO: 69) exhibió citotoxicidad de reconocimiento celular a un tipo de célula positiva diana comparable a una molécula SLT de "control". -1A-FR::scFv-5 (SEQ ID NO: 37). La molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación9::scFv-5 (SEQ ID NO: 70) exhibió citotoxicidad atenuada a esta línea celular en comparación con el control, y SLT-1A-combinación11::scFv-5 (SEQ ID NO : 71) exhibió una potencia citotóxica muy baja en comparación con el control.

Las Figuras 11-12 muestran gráficamente la actividad de caspasa inducida por las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención SLT-1A-combinación (n)::scFv-1 en comparación con la molécula de control celular "control" SLT-1A-FR : scFv- (n), cuyo componente del polipéptido efector de la toxina Shiga consistía en un fragmento de subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, excepto que comprendía un sitio de escisión por furina alterado en el extremo carboxi de su región de fragmento de toxina Shiga A1 (SLT- 1A-FR (SEQ ID NO: 5)). El porcentaje de actividad de caspasa se trazó sobre el logaritmo hasta la base 10 de la concentración de molécula de reconocimiento celular administrada a las células. Las Figuras 11-12 muestran que las moléculas de ejemplo de reconocimiento celular SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44), SLT-1A-combinación14::scFv-1 (SEQ ID NO: 50), y SLT-1A-combinación7::scFv-7 (SEQ ID NO: 81) indujo una actividad de caspasa comparable a una molécula de control de reconocimiento celular para al menos una línea celular analizada.

La Figura 13 muestra las antigenidades relativas de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención y una molécula de reconocimiento celular de control mediante análisis de transferencia Western en condiciones de desnaturalización usando tres anticuerpos diferentes que reconocen fragmentos de toxina Shiga A1. La Figura 13 muestra imágenes de múltiples geles y membranas replicados. El primer carril marcado como "Marcador MW" muestra el patrón de migración de una escalera de peso molecular de proteína, y el tamaño aproximado de cada banda de proteína de escalera está marcado en kiloDaltons (kDa). Las muestras cargadas y procesadas en los carriles numerados 1-4 se indican en la leyenda de la figura: # 1) SLT-1A::combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44); # 2) SLT-1A-FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34); # 3) SLT-1A::combinación14::scFv-1 (SEQ ID NO: 50); y SLT-1A::combinación10::scFv-1 (SEQ ID NO: 47). El panel superior muestra imágenes de un gel replicado teñido con Coomassie; el segundo panel (desde la parte superior) muestra imágenes de la membrana replicada sondeada con  $\alpha$ -SLT-1A pAb1, el tercer panel (desde la parte superior) muestra imágenes de una membrana replicada sondeada con  $\alpha$ -SLT-1A pAb2, y el último panel (desde la parte superior) muestra imágenes de una membrana replicada sondeada con mAb1 de  $\alpha$ -StxA. La Figura 13 muestra que las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44), SLT-1A-combinación10::scFv-1 (SEQ ID NO: 47) y SLT-1A-combinación14::scFv-1 (SEQ ID NO: 50) cada uno tiene una antigenidad reducida en este ensayo en comparación

con la molécula de referencia SLT-1A-FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34).

La Figura 14 muestra gráficamente las antigenicidades relativas de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención y una molécula de reconocimiento celular de control mediante análisis ELISA usando dos anticuerpos diferentes que reconocen fragmentos de toxina Shiga A1. La señal de absorbancia de ELISA normalizada se representa gráficamente como un porcentaje de la molécula de control SLT-1A-FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34). La Figura 14 muestra que las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44), SLT-1A-combinación10::scFv-1 (SEQ ID NO: 47) y SLT-1A-combinación14::scFv-1 (SEQ ID NO: 50) cada uno tiene una antigenicidad reducida en este ensayo en comparación con el control.

Las Figuras 15-16 muestran gráficamente las inmunogenicidades relativas de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención medidas a partir de sueros recogidos de un modelo de mamífero y usando ensayos ELISA en solución para detectar en el suero de cada animal la cantidad de anticuerpos que reconocen una administración Shiga toxina Una subunidad derivada de la molécula. Las moléculas de referencia de células dirigidas utilizadas para comparaciones relativas fueron SLT-1A-FR::scFv- (n), cuyo componente polipeptídico efector de toxina Shiga consistía en el polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión por furina SLT-1A-FR (SEQ ID NUMERO 5). Para cada grupo de tratamiento de animales administrado una molécula de reconocimiento celular de la presente invención, los valores porcentuales del grupo de tratamiento de molécula de referencia SLT-1A-FR::scFv- (n) se calcularon dividiendo la señal ELISA promedio para todos los sujetos en el grupo de tratamiento de la molécula de reconocimiento celular en un punto de tiempo dado con la señal ELISA promedio de los sujetos en el grupo de tratamiento de referencia SLT-1A-FR::scFv- (n). El porcentaje de la referencia para cada grupo de tratamiento experimental fue graficado en el eje Y, y el día de la recolección de suero fue graficado en el eje X. Los símbolos en las Figuras 15-16 representan la señal promedio para sujetos individuales en el grupo indicado, y las barras de error indican el error estándar de la media para los sujetos en el grupo en el punto de tiempo indicado. Las Figuras 15-16 muestran que las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación1::scFv-1 (SEQ ID NO: 43), SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44), SLT-1A-combinación10::scFv-1 (SEQ ID NO: 47), SLT-1A-combinación12::scFv-1 (SEQ ID NO: 49), SLT-1A-combinación15::scFv-1 (SEQ ID NO: 51), SLT-1A-combinación16::scFv-1 (SEQ ID NO: 52), SLT-1A-combinación19::scFv-1 (SEQ ID NO: 55), SLT-1A-combinación10::scFv-2 (SEQ ID NO: 61), y SLT-1A-combinación22::scFv-2 (SEQ ID NO: 63) exhibieron inmunogenicidad reducida en este ensayo en relación con la molécula de referencia apropiada SLT-1A-FR::scFv- (n) (SEQ ID NO: 34 o 35).

La Figura 17 muestra la resistencia a la escisión por furina de la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-FR::scFv-9, que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado, en comparación con una célula citotóxica casi idéntica. molécula dirigida que comprende un fragmento de toxina Shiga de tipo salvaje A1 con un sitio de escisión por furina de tipo salvaje (SLT-1A-WT::scFv-9). La Figura 17 muestra un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie después de la electroforesis de muestras de proteínas tratadas con furina humana purificada, recombinante o varias condiciones de control negativo. Los carriles del gel están numerados, y la leyenda de la figura indica las condiciones de pretratamiento de cada muestra de molécula de reconocimiento celular antes de cargar la muestra en el gel: la temperatura en grados Celsius (° C), la duración del pretratamiento en horas, y si se agregó cualquier furina indicando la cantidad de unidades de actividad de furina agregadas (U) por microgramo ( $\mu\text{g}$ ) de molécula de reconocimiento celular (etiquetada "U/ $\mu\text{g}$  furina") o "sin furina" para cero U/ $\mu\text{g}$  de furina añadida. El primer carril marcado como "Marcador MW" muestra el patrón de migración de una escalera de peso molecular de proteína, y el tamaño aproximado de cada banda de proteína de escalera está marcado en kiloDaltons (kDa). La leyenda de la figura indica qué región efectora de la toxina Shiga estaba presente en cada muestra de molécula de reconocimiento celular por carril, ya sea 1) un sitio de furina de tipo salvaje (WT) o 2) un motivo de furina alterado (FR). Las muestras tratadas se sometieron a 0,5 unidades de actividad de furina por microgramo de molécula de reconocimiento celular (U/ $\mu\text{g}$  de furina) a 30 ° C durante 30 horas. La Figura 17 muestra que SLT-1A-FR::scFv-9 era resistente a 0,5 unidades de actividad de furina por microgramo de SLT-1A-FR::scFv-9 a 30 ° C.

La Figura 18 muestra gráficamente la unión específica de una célula de ejemplo. molécula direccionadora de la presente invención (SEQ ID NO: 82) para dirigir células positivas en comparación con células negativas objetivo. La cantidad de molécula de reconocimiento celular que se une a las células se calculó como una intensidad de fluorescencia media integrada (iMFI) y se representó gráficamente frente a la concentración de la molécula de reconocimiento celular. El ajuste de la curva de los datos se usó para producir las líneas para los dos tipos de células diana positivas probadas.

La Figura 19 muestra gráficamente el cambio en las cargas tumorales humanas a lo largo del tiempo para grupos de sujetos en un modelo de xenoinjerto murino después de recibir una molécula de ejemplo de reconocimiento celular de la presente invención o una muestra de control solo para vehículo. La carga tumoral medida como bioluminiscencia de todo el cuerpo en fotones/segundo se graficó frente al tiempo (días después del implante tumoral). La administración de la molécula de reconocimiento celular SLT1-A-combinación7:: $\alpha\text{CD38}$ -scFv-1 (SEQ ID NO: 82) evitó el aumento de la carga tumoral observada para el grupo de control del vehículo solamente.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0227] 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.

5 [0228] 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.

10 [0229] 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.

15 [0230] 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).

20 [0231] 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).

25 [0232] 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.

30 [0233] El término "residuo de aminoácido" o "aminoácido" incluye la referencia a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido. El término "polipéptido" incluye cualquier polímero de aminoácidos o residuos de aminoácidos. El término "secuencia de polipéptido" se refiere a una serie de aminoácidos o residuos de aminoácidos que comprenden físicamente un polipéptido. Una "proteína" es una macromolécula que comprende uno o más polipéptidos o "cadenas" de polipéptido. Un "péptido" es un pequeño polipéptido de tamaño de menos de un total de 15-20 residuos de aminoácidos. El término "secuencia de aminoácidos" se refiere a una serie de aminoácidos o 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.

35 [0234] Los términos "aminoácido", "residuo de aminoácido", "secuencia de aminoácidos", o "secuencias de polipéptidos" incluyen aminoácidos de origen natural (incluyendo isoesteriómeros 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:

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

5 [0235] La frase "sustitución conservativa" con respecto a un residuo de aminoácido de un péptido, región de péptido, región de polipéptido, proteína o molécula se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos del péptido, región de péptido, región de polipéptido, proteína o molécula que no altera sustancialmente la función y la estructura del péptido, región de péptido, región de polipéptido, proteína o molécula general (véase Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (WH Freeman and Company, Nueva York (2ª ed., 1992)).

10 [0236] Para los fines de la presente invención, la frase "derivada de" cuando se refiere a un polipéptido o región polipeptídica significa que el polipéptido o región polipeptídica comprende secuencias de aminoácidos encontradas originalmente en una proteína "parental" y que ahora pueden comprender ciertas adiciones, deleciones, truncamientos, reordenamientos u otras alteraciones de los residuos de aminoácidos en relación con el polipéptido o la región polipeptídica original, siempre que una o varias funciones y una o varias estructuras de la molécula "parental" estén sustancialmente conservadas. El experto en la materia podrá identificar una molécula parental de la que se deriva un polipéptido o región polipeptídica utilizando técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, software de alineación de secuencias de proteínas.

20 [0237] Para los fines de la invención reivindicada y con respecto a una secuencia de polipéptido de toxina Shiga o polipéptido derivado de toxina Shiga, el término "tipo salvaje" generalmente se refiere a una secuencia o secuencias de proteína de toxina Shiga que se encuentran de forma natural en una especie viva, tal como, por ejemplo, una bacteria patógena, en la que la(s) secuencia(s) de proteína de toxina Shiga es una de las variantes más frecuentes. Esto contrasta con las secuencias de proteínas de la toxina Shiga que aparecen con poca frecuencia y que, aunque todavía se encuentran de forma natural, se encuentran en menos del uno por ciento de los organismos individuales de una especie determinada cuando se muestrea un número estadísticamente potente de organismos individuales de esa especie que comprenden al menos una variante de proteína de toxina Shiga. Una expansión clonal de un aislado natural fuera de su entorno natural (independientemente de si el aislado es un organismo o una molécula que comprende información de secuencia biológica) no altera el requisito natural siempre que la expansión clonal no introduzca una nueva variedad de secuencia que no esté presente en poblaciones naturales existentes de esa especie y/o no cambie las proporciones relativas de las variantes de secuencia entre sí.

30 [0238] Los términos "asociado", "que se asocia", "unido" o "que se une" con respecto a la invención reivindicada se refieren al estado de dos o más componentes de una molécula que está unida, enlazada, conectada o, en cualquier caso, acoplada para formar una sola molécula o el acto de formar dos moléculas asociadas entre sí para formar una sola molécula creando una asociación, enlace, unión y/o cualquier otra conexión entre las dos moléculas. Por ejemplo, el término "unido" puede referirse a dos o más componentes asociados por una o más interacciones atómicas de manera que se forme una sola molécula y en donde las interacciones atómicas pueden ser covalentes y/o no covalentes. Ejemplos no limitantes de asociaciones covalentes entre dos componentes incluyen enlaces peptídicos y enlaces disulfuro de cisteína-cisteína. Los ejemplos no limitantes de asociaciones no covalentes entre dos componentes moleculares incluyen enlaces iónicos.

40 [0239] Para los fines de la presente invención, el término "unido" se refiere a dos o más componentes moleculares asociados por una o más interacciones atómicas de tal manera que se forma una sola molécula y en donde las interacciones atómicas incluyen al menos un enlace covalente. Para los fines de la presente invención, el término "que se une" se refiere al acto de crear una molécula unida como se describió anteriormente.

45 [0240] Para los fines de la presente invención, el término "fusionado" se refiere a dos o más componentes proteínicos asociados por al menos un enlace covalente que es un enlace peptídico, independientemente de si el enlace peptídico implica la participación de un átomo de carbono de un el grupo ácido carboxílico o implica otro átomo de carbono, tal como, por ejemplo, el carbono  $\alpha$ , el carbono  $\beta$ , el carbono  $\gamma$ , el carbono  $\sigma$ , etc. Los ejemplos no limitantes de dos componentes proteínicos fusionados incluyen, por ejemplo, un aminoácido, péptido o polipéptido fusionado a un polipéptido a través de un enlace peptídico de modo que la molécula resultante es un polipéptido único y continuo. Para los fines de la presente invención, el término "fusión" se refiere al acto de crear una molécula fusionada como se describió anteriormente, tal como, por ejemplo, una proteína de fusión generada a partir de la fusión recombinante de regiones genéticas que cuando se traducen producen una sola molécula proteica.

55 [0241] El símbolo "::" significa que las regiones polipeptídicas antes y después se unen físicamente para formar un polipéptido continuo.

60 [0242] Como se usa en el presente documento, los términos "expresado", "que expresa" o "expresa" y sus variantes gramaticales se refieren a la traducción de un polinucleótido o ácido nucleico en una proteína. La proteína expresada puede permanecer intracelular, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o secretarse en un espacio extracelular.

[0243] 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 diana positivas" o "células diana +" y son células físicamente acopladas a la biomolécula diana extracelular especificada.

[0244] Como se usa en el presente documento, el símbolo " $\alpha$ " es la abreviatura de una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse a la biomolécula después del símbolo. El símbolo " $\alpha$ " se utiliza para referirse a la característica funcional de una región de unión de tipo inmunoglobulina en función de su capacidad para unirse a la biomolécula después del símbolo con una afinidad de unión descrita por una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  o menos.

[0245] Como se usa en el presente documento, el término "dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ )" o "dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ )" se refiere respectivamente a cualquier dominio  $V_H$  o  $V_L$  de anticuerpo (por ejemplo, un  $V_H$  o  $V_L$  humano dominio) así como cualquier derivado del mismo que retiene al menos la capacidad de unión al 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). El dominio  $AV_H$  o  $V_L$  consiste en una región "marco" alterada por los tres CDR o ABR. Las regiones marco sirven para alinear las CDR o ABR para la unión específica a un epítipo de un antígeno. Desde el extremo amino al extremo carboxi terminal, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  comprenden las siguientes regiones marco (FR) y CDR o regiones ABR: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4; o, de manera similar, FR1, ABR1, FR2, ABR2, FR3, ABR3 y FR4. Como se usa en este documento, los términos "HCDR1", "HCDR2" o "HCDR3" se usan para referirse a los CDR 1, 2 o 3, respectivamente, en un dominio  $V_H$ , y los términos "LCDR1", "LCDR2" y "LCDR3" se usan para referirse a las CDR 1, 2 o 3, respectivamente, en un dominio  $V_L$ . Como se usa en el presente documento, los términos "HABR1", "HABR2" o "HABR3" se usan para referirse a los ABR 1, 2 o 3, respectivamente, en un dominio  $V_H$ , y los términos "LABR1", "LABR2" o "LABR3" se usan para referirse a las CDR 1, 2 o 3, respectivamente, en un dominio  $V_L$  para los fragmentos  $V_{HH}$  de camélidos, IgNAR de peces cartilaginosos, fragmentos  $V_{NAR}$ , ciertos anticuerpos de dominio único y derivados de los mismos, existe un dominio variable de cadena pesada único que comprende la misma disposición básica: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Como se usa en el presente documento, los términos "HCDR1", "HCDR2" o "HCDR3" se pueden usar para referirse a las CDR 1, 2 o 3, respectivamente, en un único dominio variable de cadena pesada.

[0246] Para los fines de la presente invención, el término "efector" significa proporcionar una actividad biológica, tal como citotoxicidad, señalización biológica, catálisis enzimática, enrutamiento subcelular y/o unión intermolecular que produce un efecto o efectos alostéricos y/o el reclutamiento de uno o más factores.

[0247] Para los propósitos de la presente invención, las frases "polipéptido efector de la toxina Shiga", "región polipeptídica efectora de la toxina Shiga" y "región efectora de la toxina Shiga" se refieren a una región de polipéptido o polipéptido derivado de al menos una subunidad A de la toxina Shiga de un miembro de la familia de toxinas Shiga en donde el polipéptido o la región de polipéptido es capaz de exhibir al menos una función de toxina Shiga. Por ejemplo, las SEQ ID NO: 8, 11-27, 29-32, 348, 356-358, 363, 370-371, 373, 378-438 se derivan de StxA y SLT-1A.

[0248] Para los fines de la presente invención, una función efectora de la toxina Shiga es una actividad biológica conferida por una región polipeptídica derivada de una subunidad A de la toxina Shiga. Ejemplos no limitativos de las funciones efectoras de la toxina Shiga incluyen promover la entrada celular; deformación de la membrana lipídica; promover la internalización celular; estimular la endocitosis mediada por clatrina; dirigir el enrutamiento intracelular a varios compartimentos intracelulares, tales como, por ejemplo, el Golgi, el retículo endoplásmico y el citosol; dirigir el enrutamiento intracelular con una carga; inhibir una función o funciones del ribosoma; actividades catalíticas, tales como, por ejemplo, actividad de N-glucosidasa e inhibición catalítica de ribosomas; reducir la síntesis de proteínas, inducir la actividad de caspasas, activar caspasas efectoras, efectuar efectos citostáticos y citotoxicidad. Las actividades catalíticas de la toxina Shiga incluyen, por ejemplo, inactivación de ribosomas, inhibición de la síntesis de proteínas, actividad de N-glucosidasa, actividad de polinucleótido:adenosina glucosidasa, actividad de ARNasa y actividad de ADNasa. Las toxinas Shiga son proteínas inactivadoras de ribosomas (RIP). Las RIP pueden depurar ácidos nucleicos, polinucleósidos, polinucleótidos, ARNr, ADNss, ADNds, ARNm (y poli A) y ácidos nucleicos virales (véase, por ejemplo, Barbieri L et al., *Biochem J* 286: 1-4 (1992); Barbieri L et al., *Nature* 372: 624 (1994); Ling J et al., *FEBS Lett* 345: 143-6 (1994); Barbieri L et al., *Biochem J* 319: 507-13 (1996); Roncuzzi L, Gasperi -Campani A, *FEBS Lett* 392: 16-20 (1996); Stirpe F et al., *FEBS Lett* 382: 309-12 (1996); Barbieri L et al., *Nucleic Acids Res* 25: 518-22 (1997); Wang P, Turner N, *Nucleic Acids Res* 27: 1900-5 (1999); Barbieri L et al., *Biochim Biophys Acta* 1480: 258-66 (2000); Barbieri L et al., *J Biochem* 128: 883-9 (2000); Brigotti M et al., *Toxicon* 39: 341-8 (2001); Brigotti M et al., *FASEB J* 16: 365-72 (2002); Bagga S et al., *J Biol Chem* 278: 4813-20 (2003); Picard D et al., *J Biol Chem* 280: 20069-75 (2005)). Algunas RIP 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)). Se han observado actividades catalíticas de la toxina Shiga tanto in vitro como in vivo. Los ejemplos no limitantes de ensayos para la actividad efectora de la toxina Shiga miden diversas actividades, tales como, por ejemplo, actividad inhibidora de la síntesis de proteínas, actividad de depuración, inhibición del crecimiento celular,

citotoxicidad, actividad de relajación del ADN superenrollado y actividad nucleasa.

[0249] Como se usa en este documento, la retención de la función efectora de la toxina Shiga se refiere a ser capaz de exhibir un nivel de actividad funcional de la toxina Shiga, medida por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad, comparable a un control de polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje (por ejemplo, un fragmento de la toxina Shiga A1) o una molécula de reconocimiento celular que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje (por ejemplo, un fragmento de la toxina Shiga A1) en las mismas condiciones. Para la función efectora de la toxina Shiga de la inactivación del ribosoma o la inhibición de los ribosomas, la función efectora de la toxina Shiga retenida exhibe una  $IC_{50}$  de 10.000 pM o menos en un entorno in vitro, tal como, por ejemplo, mediante el uso de un ensayo conocido por el experto y/o descrito aquí. Para la función efectora de la toxina Shiga de la citotoxicidad en un ensayo de destrucción celular positiva de diana, la función efectora de la toxina Shiga retenida exhibe una  $CD_{50}$  de 1,000 nM o menos, dependiendo del tipo de célula y su expresión de la biomolécula diana extracelular apropiada, como se muestra, por ejemplo, usando un ensayo conocido por el experto en la materia y/o descrito aquí.

[0250] Para los fines de la invención reivindicada, el término "equivalente" con respecto a la inhibición de ribosomas significa un nivel medido empíricamente de actividad inhibidora de ribosomas, medida por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad, que es reproducible dentro del 10% o menos de la actividad de la molécula de referencia (por ejemplo, la segunda molécula de reconocimiento celular o la tercera molécula de reconocimiento celular) en las mismas condiciones.

[0251] Para los fines de la invención reivindicada, el término "equivalente" con respecto a la citotoxicidad significa un nivel de citotoxicidad medido empíricamente, medido por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad, que es reproducible dentro del 10% o menos de la actividad de la molécula de referencia (por ejemplo, la segunda molécula de reconocimiento celular o la tercera molécula de reconocimiento celular) en las mismas condiciones.

[0252] Como se usa en el presente documento, el término "atenuado" con respecto a la citotoxicidad significa que una molécula exhibe o exhibió una  $CD_{50}$  entre 10 y 100 veces una  $CD_{50}$  exhibida por una molécula de referencia en las mismas condiciones.

[0253] Los valores de  $IC_{50}$  y  $CD_{50}$  inexactos no deben considerarse al determinar un nivel de actividad de la función efectora de la toxina Shiga. Para algunas muestras, es posible que no se puedan obtener valores precisos para  $IC_{50}$  o  $CD_{50}$  debido a la imposibilidad de recopilar los puntos de datos necesarios para un ajuste de curva preciso. Por ejemplo, en teoría, ni un  $IC_{50}$  ni  $CD_{50}$  se puede determinar si la inhibición de ribosomas mayor que 50% o muerte celular, respectivamente, no se produce en una serie de concentración para una muestra dada. Los datos insuficientes para ajustar con precisión una curva como se describe en el análisis de los datos de ensayos de ejemplo de la función efectora de la toxina Shiga, tales como, por ejemplo, los ensayos descritos en los ejemplos a continuación, no deben considerarse representativos de la función efectora real de la toxina Shiga.

[0254] Un fallo en la detección de actividad en la función efectora de la toxina Shiga puede deberse a una expresión inadecuada, plegamiento de polipéptidos y/o estabilidad de la proteína en lugar de una 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 se determine empíricamente que una causa subyacente de la función efectora baja o nula se relaciona con la expresión o la estabilidad de la proteína, un experto en la materia puede ser capaz de compensar dichos factores utilizando la química de la proteína y las técnicas de ingeniería molecular conocidas en la técnica, tal que se pueda restaurar y medir una actividad efectora funcional de la toxina Shiga. Como ejemplos, la expresión incorrecta basada en células puede compensarse mediante el uso de diferentes secuencias de control de expresión; y el plegamiento y/o estabilidad inadecuada de polipéptidos pueden beneficiarse de secuencias terminales estabilizadoras, o mutaciones compensatorias en regiones no efectoras que estabilizan la estructura tridimensional de la molécula.

[0255] Ciertas funciones efectoras de la toxina Shiga no son fácilmente medibles, por ejemplo, funciones de enrutamiento subcelular. Por ejemplo, no existe un ensayo cuantitativo de rutina para distinguir si el fracaso de un polipéptido efector de toxina Shiga para ser citotóxico y/o administrar un epítipo heterólogo se debe a un enrutamiento subcelular incorrecto, pero en un momento en que las pruebas están disponibles, entonces la toxina Shiga los polipéptidos efectores pueden analizarse para cualquier nivel significativo de enrutamiento subcelular en comparación con el polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje apropiado. Sin embargo, si un componente del polipéptido efector de la toxina Shiga de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención presenta una citotoxicidad comparable o equivalente a una construcción de subunidad de la toxina A Shiga de tipo salvaje, entonces se infiere que el nivel de actividad de enrutamiento subcelular es comparable o equivalente, respectivamente, al nivel de actividad de enrutamiento subcelular de una construcción de subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje al menos en las condiciones probadas.

[0256] Cuando estén disponibles nuevos ensayos para las funciones individuales de la toxina Shiga, los polipéptidos

efectores de la toxina Shiga y/o las moléculas de reconocimiento celular que comprenden los polipéptidos efectores de la toxina Shiga pueden analizarse para cualquier nivel de esas funciones efectoras de la toxina Shiga, como un ser dentro de 1000- veces o 100 veces o menos la actividad de un polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje o que exhibe una actividad de 3 a 30 veces o más en comparación con un polipéptido efector de toxina Shiga de inactivación funcional.

[0257] El enrutamiento subcelular suficiente puede deducirse simplemente observando los niveles de actividad citotóxica de una molécula en ensayos de citotoxicidad, tales como, por ejemplo, ensayos de citotoxicidad basados en la presentación del epítipo de células T o en función de una función efectora de toxina que implica un retículo citosólico y/o endoplásmico. -localizado, sustrato objetivo.

[0258] Como se usa en este documento, la retención de la función efectora de la toxina Shiga "significativa" se refiere a un nivel de actividad funcional de la toxina Shiga, medido por un ensayo cuantitativo apropiado con reproducibilidad comparable a un control de polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje (por ejemplo, un Fragmento de toxina Shiga A1). Para la inhibición in vitro del ribosoma, la función efectora de la toxina Shiga significativa exhibe una  $IC_{50}$  de 300 pM o menos, dependiendo de la fuente de los ribosomas utilizados en el ensayo (por ejemplo, una bacteria, una arquea o una eucariota (algas, hongos, plantas o animales).) fuente). Esta es una inhibición significativamente mayor en comparación con la  $IC_{50}$  aproximada de 100,000 pM para el mutante doble SLT-1A 1-251 disruptiva catalíticamente (Y77S/E167D). Para la citotoxicidad en un ensayo de destrucción celular objetivo positivo en cultivo celular de laboratorio, la función efectora de toxina Shiga significativa exhibe un  $CD_{50}$  de 100, 50, 30 nM o menos, dependiendo de la (s) biomolécula (s) objetivo de la región de unión y el tipo de célula, particularmente la expresión de ese tipo de célula y/o la representación en la superficie celular de la (s) biomolécula (s) diana (s) extracelular (s) apropiada (s) y/o el (los) epítipo (s) extracelular (s) objetivo (s) por la molécula que se está evaluando. Esta es una citotoxicidad significativamente mayor para la población de células apropiadas y positivas para el objetivo en comparación con una subunidad A de la toxina Shiga sola (o un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje), sin una región de unión de reconocimiento celular, que tiene un  $CD_{50}$  de 100- 10,000 nM, dependiendo de la línea celular.

[0259] Para los propósitos de la presente invención y con respecto a la función efectora de la toxina Shiga de una molécula de la presente invención, el término "actividad razonable" se refiere a exhibir al menos un nivel moderado (por ejemplo, dentro de 11 veces a 1,000 veces) de la actividad efectora de la toxina Shiga como se define en el presente documento en relación con una molécula que comprende una toxina Shiga natural, en la que la actividad efectora de la toxina Shiga se selecciona del grupo que consiste en: eficiencia de internalización, eficiencia de enrutamiento subcelular al citosol, presentación del epítipo administrándolo por un célula (s) diana (s), inhibición del ribosoma y citotoxicidad. Para la citotoxicidad, un nivel razonable de actividad efectora de la toxina Shiga incluye estar dentro de 1,000 veces de una construcción de toxina Shiga de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, exhibir un  $CD_{50}$  de 500 nM o menos cuando una construcción de toxina Shiga de tipo salvaje exhibe un  $CD_{50}$  de 0,5 nM (por ejemplo, una molécula de reconocimiento celular que comprende un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje).

[0260] Para los fines de la presente invención y con respecto a la citotoxicidad de una molécula de la presente invención, el término "óptimo" se refiere a un nivel de citotoxicidad mediada por el dominio catalítico de la toxina Shiga que está dentro de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces la citotoxicidad de una molécula que comprende el fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje (por ejemplo, una subunidad A de la toxina Shiga o ciertas variantes truncadas de la misma) y/o una toxina Shiga natural.

[0261] Cabe señalar que, incluso si la citotoxicidad de un polipéptido de toxina efector Shiga se reduce con relación a una de tipo salvaje Shiga toxina A de la subunidad o fragmento del mismo, en la práctica, las aplicaciones que utilizan atenuadas, los polipéptidos de la toxina efectoras Shiga pueden ser igual o más eficaz que el uso de polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje porque las variantes de mayor potencia pueden exhibir efectos indeseables que se minimizan o reducen en variantes de potencia citotóxica reducida. Las toxinas Shiga de tipo salvaje son muy potentes, ya que pueden matar una célula intoxicada después de que solo una molécula de toxina haya alcanzado el citosol de la célula intoxicada o tal vez después de que solo cuarenta moléculas de toxina se hayan internalizado en la célula intoxicada. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga con funciones efectoras de la toxina Shiga incluso considerablemente reducidas, tales como, por ejemplo, enrutamiento subcelular o citotoxicidad, en comparación con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje, pueden ser lo suficientemente potentes para aplicaciones prácticas, como, por ejemplo, aplicaciones que involucran muerte de células, administración de epítipos heterólogos y/o detección de células específicas y sus compartimentos subcelulares. Además, ciertos polipéptidos efectores de la toxina Shiga de actividad reducida pueden ser particularmente útiles para administrar cargas (por ejemplo, un material exógeno adicional o epítipo de células T) a ciertas ubicaciones intracelulares o compartimentos subcelulares de células diana.

[0262] El término "citotoxicidad selectiva" con respecto a la actividad citotóxica de una molécula se refiere al nivel relativo de citotoxicidad entre una población celular positiva diana de biomolécula (por ejemplo, un tipo de célula diana) y una población celular espectadora no dirigida (por ejemplo, un tipo de célula negativa biomolécula diana),

que puede expresarse como una relación de la concentración citotóxica semimáxima (CD<sub>50</sub>) para un tipo de célula diana sobre el CD<sub>50</sub> para un tipo de célula no dirigida para proporcionar una métrica de selectividad o indicación citotóxica de la preferencia de matar una célula diana frente a una célula no dirigida.

5 [0263] La representación y/o densidad de la superficie celular de una biomolécula diana extracelular dada (o epítipo extracelular de una biomolécula diana dada) puede influir en las aplicaciones para las que se pueden usar de manera más adecuada ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención. Las diferencias en la representación de la superficie celular y/o la densidad de una biomolécula diana dada entre las células pueden alterar, tanto cuantitativa como cualitativamente, la eficiencia de la internalización celular y/o la potencia de citotoxicidad de una molécula de reconocimiento celular dada de la presente invención. La representación y/o densidad de la superficie celular de una biomolécula diana dada puede variar mucho entre las células positivas a la biomolécula diana o incluso en la misma célula en diferentes puntos del ciclo celular o la diferenciación celular. La representación total de la superficie celular de una biomolécula diana dada y/o de ciertos epítopos extracelulares de una biomolécula diana dada en una célula particular o población de células puede determinarse usando procedimientos conocidos por el experto, tales como procedimientos que implican la citometría de flujo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

20 [0264] Como se usa en el presente documento, los términos "alterado", "alteración" o "alteración", y las variantes gramaticales de los mismos, con respecto a una región o característica de polipéptido dentro de un polipéptido se refiere a una alteración de al menos un aminoácido dentro del región o composición de la función alterada. Las alteraciones de aminoácidos incluyen diversas mutaciones, tales como, por ejemplo, una delección, inversión, inserción o sustitución que altera la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Las alteraciones de aminoácidos también incluyen cambios químicos, tales como, por ejemplo, la alteración de uno o más átomos en un grupo funcional de aminoácidos o la adición de uno o más átomos a un grupo funcional de aminoácidos.

25 [0265] Como se usa en el presente documento, "desinmunizado" significa un potencial antigénico y/o inmunogénico reducido después de la administración a un cordado en comparación con una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una región peptídica de tipo salvaje, región polipeptídica o polipéptido. Esto incluye una reducción en el potencial antigénico y/o inmunogénico general a pesar de la introducción de uno o más epítopos de novo, antigénicos y/o inmunogénicos en comparación con una molécula de referencia. Para ciertas realizaciones, "desinmunizado" significa que una molécula exhibió una antigenicidad y/o inmunogenicidad reducida después de la administración a un mamífero en comparación con una molécula "parental" de la que se deriva, tal como, por ejemplo, un fragmento A1 de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención es capaz de exhibir una antigenicidad relativa en comparación con una molécula de referencia que se reduce en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más que la antigenicidad de la molécula de referencia en las mismas condiciones medidas por el mismo ensayo, como, por ejemplo, un ensayo conocido por el experto en la materia y/o descrito aquí como un ELISA cuantitativo o análisis de transferencia Western. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención es capaz de exhibir una inmunogenicidad relativa en comparación con una molécula de referencia que se reduce en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o más que la inmunogenicidad de la molécula de referencia en las mismas condiciones medidas por el mismo ensayo, como, por ejemplo, un ensayo conocido por el experto y/o se describe en el presente documento como una medición cuantitativa de anticuerpos antimoléculas producidos en un mamífero (s) después de recibir la administración parenteral de la molécula en un punto temporal dado.

45 [0266] Las inmunogenicidades relativas de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo se determinaron usando un ensayo para respuestas de anticuerpos in vivo a las moléculas de reconocimiento celular después de repetidas administraciones parenterales durante períodos de muchos.

50 [0267] Para los propósitos de la presente invención, la frase "de células B y/o de células T CD4 + de-inmunizado" significa que la molécula tiene un reducido antigénico y/o potencial inmunogénico tras la administración a un mamífero con respecto a cualquiera de las células B antigenicidad o inmunogenicidad y/o antigenicidad o inmunogenicidad de células T CD4 +. Para ciertas realizaciones, "inmunización de células B" significa que una molécula exhibió una antigenicidad y/o inmunogenicidad reducida de células B después de la administración a un mamífero en comparación con una molécula "parental" de la que se derivó, tal como, por ejemplo, un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje. Para ciertas realizaciones, "células T CD4 + desinmunizadas" significa que una molécula exhibió una antigenicidad y/o inmunogenicidad reducida de células T CD4 después de la administración a un mamífero en comparación con una molécula "parental" de la que se deriva, como p. Ej., un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje.

60 [0268] El término "endógeno" con respecto a un epítipo de células B, epítipo de células T CD4 +, región de epítipo de células B o región de epítipo de células T CD4 + en un polipéptido efector de toxina Shiga se refiere a un epítipo presente en un medio silvestre -tipo Shiga toxina A subunidad.

65 [0269] Para los fines de la presente invención, la frase "células T CD8 + hiperinmunizadas" significa que la molécula,

cuando está presente dentro de una célula nucleada, cordada dentro de un cordado vivo, tiene un potencial antigénico y/o inmunogénico aumentado con respecto a CD8 + Antigenicidad o inmunogenicidad de células T. Comúnmente, las moléculas inmunizadas con células T CD8 + son capaces de internalización celular a un compartimento endosómico temprano de una célula nucleada y cordada debido a una característica (s) inherente o como un componente de una molécula de reconocimiento celular.

[0270] Para los fines de la presente invención, el término "heterólogo" significa una fuente diferente que una Subunidad A de una toxina Shiga natural, por ejemplo, un polipéptido heterólogo no se encuentra de forma natural como parte de ninguna Subunidad A de una toxina Shiga nativa. El término "heterólogo" con respecto al epítipo de células T o al componente epítipo-péptido de células T de un polipéptido de la presente invención se refiere a un epítipo o secuencia peptídica que no se produjo inicialmente en el polipéptido a modificar, pero que ha sido modificado añadido al polipéptido, ya sea a través de los procesos de inclusión, fusión, inserción y/o sustitución de aminoácidos como se describe en este documento, o por cualquier otro medio de ingeniería. El resultado es un polipéptido modificado que comprende un epítipo de células T extraño al polipéptido original no modificado, es decir, el epítipo de células T no estaba presente en el polipéptido original.

[0271] El término "integrado" y las variantes gramaticales del mismo con respecto a un epítipo de células T o un componente epítipo-péptido de células T de un polipéptido de la presente invención se refiere al reemplazo interno de uno o más aminoácidos dentro de una región polipeptídica con diferentes aminoácidos para generar una nueva secuencia de polipéptidos que comparta el mismo número total de residuos de aminoácidos con la región polipeptídica inicial. Por lo tanto, el término "integrado" no incluye ninguna fusión terminal externa de ningún componente adicional de aminoácido, péptido o polipéptido al polipéptido de partida ni ninguna inserción interna adicional de cualquier residuo de aminoácido adicional, sino que solo incluye sustituciones para el aminoácido existente ácidos El reemplazo interno se puede lograr simplemente mediante la sustitución de residuos de aminoácidos o mediante una serie de sustituciones, deleciones, inserciones y/o inversiones. Si se usa una inserción de uno o más aminoácidos, entonces se debe eliminar el número equivalente de aminoácidos proximales junto a la inserción para dar como resultado un epítipo de células T integrado. Esto contrasta con el uso del término "insertado" con respecto a un epítipo de células T contenido dentro de un polipéptido de la presente invención para referirse a la inserción de uno o más aminoácidos internamente dentro de un polipéptido que da como resultado un nuevo polipéptido que tiene un mayor número de residuos de aminoácidos en comparación con el polipéptido de partida.

[0272] El término "insertado" y las variantes gramaticales del mismo con respecto a un epítipo de células T contenido dentro de un polipéptido de la presente invención se refiere a la inserción de uno o más aminoácidos dentro de un polipéptido que da como resultado una nueva secuencia de polipéptidos que tiene un aumento cantidad de residuos de aminoácidos en comparación con el polipéptido de partida. La inserción "pura" de un péptido-epítipo de células T es cuando el polipéptido resultante aumenta en longitud por el número de residuos de aminoácidos equivalentes al número de residuos de aminoácidos en todo el péptido-epítipo de células T insertado. Las frases "parcialmente insertadas", "incrustadas e insertadas" y las variantes gramaticales de las mismas con respecto a un epítipo de células T contenido dentro de un polipéptido de la presente invención, se refieren a cuándo el polipéptido resultante aumentó en longitud, pero en menos del número de residuos de aminoácidos equivalentes a la longitud de todo el péptido epítipo de células T insertado. Las inserciones, ya sean "puras" o "parciales", incluyen cualquiera de las inserciones descritas anteriormente, incluso si otras regiones del polipéptido no próximas al sitio de inserción dentro del polipéptido se eliminan, lo que resulta en una disminución en la longitud total del polipéptido final porque el polipéptido final todavía comprende una inserción interna de uno o más aminoácidos de un péptido-epítipo de células T dentro de una región polipeptídica.

[0273] Como se usa en el presente documento, el término "administración de epítipos de células T" cuando describe una actividad funcional de una molécula significa que una molécula proporciona la actividad biológica de localización dentro de una célula en un compartimento subcelular que es competente para dar como resultado la escisión proteasómica de una parte proteica de la molécula que comprende un epítipo-péptido de célula T. La función de "entrega de epítipos de células T" de una molécula se puede analizar observando la presentación de MHC de una carga de epítipo-péptido de células T de la molécula en una superficie celular de una célula a la que se le administró exógenamente la molécula o en la que se inició el ensayo con la célula que contiene la molécula en uno o más de sus compartimentos endosómicos. En general, la capacidad de una molécula para administrar un epítipo de células T a un proteasoma se puede determinar donde la ubicación inicial de la molécula de "liberación de epítipos de células T" es un compartimento endosómico temprano de una célula, y a continuación, la molécula es empíricamente demostrado para administrar el epítipo-péptido al proteasoma de la célula. Sin embargo, también se puede determinar una capacidad de "administración de epítipos de células T" donde la molécula comienza en una ubicación extracelular y se muestra empíricamente, directa o indirectamente, para administrar el epítipo a una célula y a proteasomas de la célula. Por ejemplo, ciertas moléculas que "entregan epítipos de células T" pasan a través de un compartimento endosómico de la célula, como, por ejemplo, después de la entrada endocítica en esa célula. Alternativamente, se puede observar la actividad de "liberación de epítipo de células T" para una molécula que comienza en una ubicación extracelular por la cual la molécula no ingresa a ningún compartimento endosómico de una célula; en cambio, la molécula de "liberación de epítipo de células T" ingresa a una célula y libera un

Epítipo-péptido de células T a proteasomas de la célula, presumiblemente porque la molécula "liberadora de epítipos de células T" dirigió su propio enrutamiento a un compartimento subcelular competente para dar como resultado la escisión proteasómica de su componente epítipo-péptido de células T.

5 [0274] Para los fines de la presente invención, la frase "proximal a un extremo amino" con referencia a la posición de una región de polipéptido efector de toxina Shiga de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención se refiere a una distancia en la que al menos uno el residuo de aminoácido de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga está dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más, por ejemplo, hasta 18-20 residuos de aminoácidos, de un extremo amino de la molécula de reconocimiento celular siempre que la molécula de reconocimiento celular sea capaz de exhibir el nivel apropiado de actividad funcional del efector de la toxina Shiga señalado aquí (por ejemplo, un cierto nivel de potencia citotóxica). Por lo tanto, para ciertas realizaciones de la presente invención, cualquier residuo de aminoácido fusionado con el extremo amino terminal al polipéptido efector de toxina Shiga no debería reducir ninguna función efectora de toxina Shiga (por ejemplo, obstaculizando estéricamente una estructura (s) cerca del extremo amino terminal de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga) de modo que la actividad funcional del polipéptido efector de la toxina Shiga se reduzca por debajo del nivel de actividad apropiado requerido en este documento.

[0275] Para los fines de la presente invención, la frase "más próxima a un extremo amino" con referencia a la posición de una región de polipéptido efector de toxina Shiga dentro de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención en comparación con otro componente (p. Ej., una región de unión celular dirigida, un resto molecular y/o material exógeno adicional) se refiere a una posición en la que al menos un residuo de aminoácido del extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga está más cerca del extremo amino de un componente polipeptídico lineal de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención en comparación con el otro componente referenciado.

25 [0276] Para los fines de la presente invención, la frase "dominio enzimático activo derivado de una subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga" se refiere a tener la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas a través de un mecanismo catalítico de inactivación de ribosomas. Las actividades enzimáticas de las toxinas Shiga naturales pueden definirse por la capacidad de inhibir la traducción de proteínas utilizando ensayos conocidos por el experto en la materia, tales como, por ejemplo, ensayos in vitro que implican traducción de ARN en ausencia de células vivas o ensayos in vivo que involucran traducción de ARN en una célula viva Usando ensayos conocidos por el experto y/o descritos aquí, la potencia de una actividad enzimática de la toxina Shiga puede evaluarse directamente observando la actividad de N-glucosidasa hacia el ARN ribosómico (ARNr), como, por ejemplo, un ensayo de corte de ribosomas, y/o indirectamente observando la inhibición de la función ribosómica y/o la síntesis de proteínas.

35 [0277] Para los fines de la presente invención, el término "región de fragmento de toxina Shiga A1" se refiere a una región de polipéptido que consiste esencialmente en un fragmento de toxina Shiga A1 y/o derivado de un fragmento de toxina Shiga A1 de una toxina Shiga.

40 [0278] Para los fines de la presente invención, los términos "terminal", "extremo amino terminal" o "extremo carboxi terminal" con respecto a una molécula de reconocimiento celular se refieren generalmente al último residuo de aminoácido de una cadena polipeptídica del molécula de reconocimiento celular (p. ej., una única cadena de polipéptidos continua). Una molécula de reconocimiento celular puede comprender más de un polipéptido o proteínas, y, por lo tanto, una molécula de reconocimiento celular de la presente invención puede comprender múltiples terminales amino y terminales carboxi. Por ejemplo, el "extremo amino terminal" de una molécula de reconocimiento celular puede definirse por el primer residuo de aminoácido de una cadena de polipéptidos que representa el extremo amino terminal del polipéptido, que generalmente se caracteriza por un residuo de aminoácido inicial que no tiene un enlace peptídico con ningún residuo de aminoácido que involucre el grupo amino primario del residuo de aminoácido inicial o que involucre el nitrógeno equivalente para los residuos de aminoácido inicial que son miembros de la clase de residuos de alfa-aminoácido N-alquilados. De manera similar, el "extremo carboxi terminal" de una molécula de reconocimiento celular puede definirse por el último residuo de aminoácido de una cadena de polipéptidos que representa el extremo carboxilo-terminal del polipéptido, que generalmente se caracteriza por un residuo de aminoácido final que hace no tiene ningún residuo de aminoácido unido por un enlace peptídico al carbono alfa de su grupo carboxilo primario.

55 [0279] Para los fines de la presente invención, los términos "terminal", "extremo amino terminal" o "extremo carboxi terminal" con respecto a una región polipeptídica se refieren a los límites regionales de esa región, independientemente de si hay residuos de aminoácidos adicionales están unidos por enlaces peptídicos fuera de esa región. En otras palabras, los terminales de la región polipeptídica independientemente de si esa región está fusionada con otros péptidos o polipéptidos. Por ejemplo, una proteína de fusión que comprende dos regiones proteicas, por ejemplo, una región de unión que comprende un péptido o polipéptido y un polipéptido efector de toxina Shiga, puede tener una región de polipéptido efector de toxina Shiga con un extremo carboxilo terminal que termina en el residuo de aminoácido 251 de Shiga región de polipéptido efector de toxina a pesar de un enlace peptídico que implica el residuo 251 a un residuo de aminoácido en la posición 252 que representa el comienzo de otra región proteica, por ejemplo, la región de unión. En este ejemplo, el término carboxi-terminal de la región del

65

5 polipéptido efector de toxina Shiga se refiere al residuo 251, que no es un término de la proteína de fusión, sino que representa un límite regional interno. Por lo tanto, para las regiones polipeptídicas, los términos "terminal", "extremo amino terminal" y "extremo carboxi terminal" se usan para referirse a los límites de las regiones polipeptídicas, ya sea que el límite sea un término físico o una posición interna incrustada dentro de un cadena polipeptídica más grande.

10 [0280] Para los fines de la presente invención, la frase "región carboxi-terminal de un fragmento de toxina Shiga A1" se refiere a una región polipeptídica derivada de un fragmento de toxina Shiga A1 natural, comenzando la región con un residuo hidrófobo (por ejemplo, V236 de StxA-A1 y SLT-1A1, y V235 de SLT-2A1) que es seguido por un residuo hidrofóbico y terminando la región con el sitio de escisión por furina conservada entre los polipéptidos del fragmento A1 de la toxina Shiga y terminando en la unión entre el fragmento A1 y el fragmento A2 en las subunidades nativas de la toxina Shiga A. Para los fines de la presente invención, la región carboxi-terminal de un fragmento de toxina Shiga A1 incluye una región peptídica derivada del extremo carboxi terminal de un polipéptido de fragmento de toxina Shiga A1, tal como, por ejemplo, una región peptídica que comprende o consiste esencialmente en el extremo carboxi terminal de un fragmento de toxina Shiga A1. Los ejemplos no limitantes de regiones peptídicas derivadas del extremo carboxi terminal de un fragmento de toxina Shiga A1 incluyen las secuencias de residuos de aminoácidos situadas de forma nativa desde la posición 236 a la posición 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250 o 251 en StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-1A (SEQ ID NO: 1); y desde la posición 235 a la posición 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249 o 250 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3).

20 [0281] Para los fines de la presente invención, la frase "proximal al extremo carboxi terminal de un polipéptido de fragmento A1" con respecto a un resto molecular unido y/o región de unión se refiere a estar dentro de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 residuos de aminoácidos del residuo de aminoácido que define el último residuo del polipéptido del fragmento de la toxina Shiga A1.

25 [0282] Para los fines de la presente invención, la frase "cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1" incluye cualquier resto molecular de un tamaño de 4,5 kDa o mayor (por ejemplo, una región de unión de tipo inmunoglobulina) unida y/o fusionado a un residuo de aminoácido en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1, tal como, por ejemplo, el residuo de aminoácido derivado del residuo de aminoácido colocado de forma nativa en cualquiera de las posiciones 236 a 251 en StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o de 235 a 250 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3). Para los fines de la presente invención, la frase "cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1" también incluye cualquier resto molecular de un tamaño de 4,5 kDa o mayor (por ejemplo, una región de unión de tipo inmunoglobulina) unida y/o fusionado a un residuo de aminoácido en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1, tal como, por ejemplo, el residuo de aminoácido carboxi terminal a la última región derivada del fragmento de aminoácido A1 y/o el polipéptido efector de la toxina Shiga. Para los fines de la presente invención, la frase "cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1" también incluye cualquier resto molecular de un tamaño de 4,5 kDa o mayor (por ejemplo, una región de unión de tipo inmunoglobulina) que impide físicamente reconocimiento del extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1, tal como, por ejemplo, reconocimiento por la maquinaria ERAD de una célula eucariota.

35 [0283] Para los propósitos de la presente invención, una región de unión, tal como, por ejemplo, una región de unión de tipo inmunoglobulina, que comprende un polipéptido que comprende al menos cuarenta aminoácidos y que está unido (por ejemplo, fusionado) al extremo carboxi terminal de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende una región derivada del fragmento A1 es un resto molecular que "cubre estéricamente el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1".

40 [0284] Para los fines de la presente invención, una región de unión, tal como, por ejemplo, una región de unión de tipo inmunoglobulina, que comprende un polipéptido que comprende al menos cuarenta aminoácidos y que está unido (por ejemplo, fusionado) al extremo carboxi terminal de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende una región derivada del fragmento A1 es un resto molecular que "obstaculiza el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1".

45 [0285] Para los fines de la presente invención, el término "fragmento A1 de un miembro de la familia de toxinas Shiga" se refiere al fragmento amino terminal restante de una subunidad A de toxina Shiga después de la proteólisis por furina en el sitio de escisión por furina conservado entre Subunidades A de toxina Shiga y posicionado entre el fragmento A1 y el fragmento A2 en subunidades A de toxina Shiga de tipo salvaje.

50 [0286] Para los fines de la invención reivindicada, la frase "motivo de escisión por furina en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1" se refiere a un motivo específico de escisión por furina conservado entre las subunidades A de la toxina Shiga y hac de puente de la unión entre el fragmento A1 y el fragmento A2 en subunidades de toxina Shiga de origen natural.

55 [0287] Para los fines de la presente invención, la frase "sitio de escisión por furina proximal al extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1" se refiere a cualquier sitio de escisión por furina identificable que tenga un



residuo de aminoácido dentro de una distancia de menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más residuos de aminoácidos del residuo de aminoácido que define el último residuo de aminoácido en la región del fragmento A1 o región derivada del fragmento A1, incluyendo un motivo de escisión por furina situado en el extremo carboxi terminal de una región de fragmento A1 o región derivada de fragmento A1, tal como, por ejemplo, en una posición próxima al enlace de la región derivada de fragmento A1 a otro componente de la molécula, tal como, por ejemplo, un resto molecular de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

[0288] Para los fines de la presente invención, la frase "motivo de escisión por furina alterada" se refiere a (i) un motivo de escisión por furina específico como se describe aquí en la Sección IB y (ii) que comprende una mutación y/o truncamiento que puede conferir una molécula con una reducción en la escisión por furina en comparación con una molécula de referencia, tal como, por ejemplo, una reducción en la escisión por furina que se observa reproduciblemente en 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o menos (incluido el 100% sin escisión) que la escisión con furina de una molécula de referencia observada en el mismo ensayo en las mismas condiciones. El porcentaje de escisión con furina en comparación con una molécula de referencia se puede expresar como una relación de material escindido: no escindido de la molécula de interés dividido por el material escindido: no escindido de la molécula de referencia (ver Ejemplos, supra). Los ejemplos no limitantes de moléculas de referencia adecuadas incluyen ciertos moléculas que comprenden un motivo de escisión con furina de toxina Shiga de tipo salvaje y/o sitio de escisión con furina como se describe aquí en la Sección IB, Sección IV-B y/o los Ejemplos) y/o moléculas utilizadas como moléculas de referencia en los Ejemplos a continuación.

[0289] Para los fines de la presente invención, la frase "resistente a la escisión por furina" significa que una molécula o región de polipéptido específica de la misma exhibe menos escisión por furina de manera reproducible que (i) el extremo carboxi terminal de un fragmento de toxina Shiga A1 en una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje o (ii) el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 de la construcción en la que el sitio de escisión por furina natural que se sitúa de forma nativa en la unión entre los fragmentos A1 y A2 no se altera; según lo analizado por cualquier medio disponible para el trabajador calificado, incluso mediante el uso de un procedimiento descrito en este documento.

[0290] Para los fines de la presente invención, la frase "dominio enzimático activo derivado de una subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga" se refiere a una estructura de polipéptido que tiene la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas mediante la inactivación catalítica de un ribosoma basado en una actividad enzimática de la toxina Shiga. La capacidad de una estructura molecular para exhibir actividad inhibitoria de la síntesis de proteínas y/o la inactivación catalítica de un ribosoma se puede observar usando varios ensayos conocidos por el experto, tales como, por ejemplo, ensayos in vitro que involucran ensayos de traducción de ARN en ausencia de células vivas o ensayos in vivo que involucran los ribosomas de células vivas. Por ejemplo, usando ensayos conocidos por el experto, la actividad enzimática de una molécula basada en una actividad enzimática de la toxina Shiga se puede evaluar directamente observando la actividad de N-glucosidasa hacia el ARN ribosómico (ARNr), tal como, por ejemplo, un ensayo de corte de ribosomas., y/o indirectamente observando la inhibición de la función ribosómica, la traducción de ARN y/o la síntesis de proteínas.

[0291] Tal como se usa en el presente documento con respecto a un polipéptido efector de toxina Shiga, una "combinación" describe un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende dos o más subregiones en las que cada subregión comprende al menos uno de los siguientes: (1) una alteración en un epítipo endógeno o región de epítipo; (2) un epítipo-péptido de células T heterólogo integrado; (3) un epítipo-péptido de células T heterólogo insertado; y (4) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región de fragmento A1.

### Introducción

[0292] La presente invención proporciona diversos polipéptidos efectores de toxina Shiga en combinación y moléculas de reconocimiento celular que comprenden los mismos. Ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención combinan elementos estructurales que dan como resultado dos o más propiedades en una sola molécula, tales como, por ejemplo, la capacidad de 1) exhibir una antigenicidad y/o inmunogenicidad reducida en comparación con variantes moleculares que carecen de una combinación particular de elementos, 2) exhibir escisión por proteasa reducida en comparación con variantes moleculares que carecen de esa combinación particular de elementos, 3) exhibir toxicidad inespecífica reducida para un organismo multicelular a ciertas dosis en comparación con variantes moleculares que carecen de esa combinación particular de elementos, 4) administrar un epítipo de células T integrado o insertado al sistema MHC de clase I, una célula para la presentación en la superficie celular, y/o 5) exhibir citotoxicidad potente. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención pueden servir como armazones para crear diversas moléculas de reconocimiento celular, tales como, por ejemplo, moléculas terapéuticas citotóxicas, dirigidas a células; vehículos de administración dirigidos a células, no tóxicos; y moléculas de diagnóstico dirigidas a células.

### I. Las estructuras generales de los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la invención

[0293] Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención comprenden al menos un polipéptido efector de la toxina Shiga derivado de las subunidades A de la toxina Shiga de tipo salvaje, pero comprenden una o más modificaciones estructurales, tales como, por ejemplo, una mutación como un truncamiento y/o sustituciones de residuos de aminoácidos. Para ciertas realizaciones, la presente invención implica la ingeniería de polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga mejorados que comprenden la combinación de dos o más de las siguientes subregiones del polipéptido efector de la toxina Shiga: (1) una subregión desimmunizada, (2) una subregión resistente a la escisión por la proteasa cerca del extremo carboxi terminal de una región del fragmento de la toxina Shiga A1, y (3) una subregión introducida o insertada en el epítipo de células T.

[0294] Un polipéptido efector de toxina Shiga es un polipéptido derivado de un miembro de la subunidad A de toxina Shiga de la familia de toxinas Shiga que es capaz de exhibir una o más funciones de toxina Shiga (ver, por ejemplo, Cheung M et al., Mol Cancer 9: 28 (2010); WO 2014/164693; WO 2015/113005; WO 2015/113007; WO 2015/138452; WO 2015/191764). Las funciones de la toxina Shiga incluyen, por ejemplo, aumentar la internalización celular, dirigir el enrutamiento subcelular desde un compartimento endosómico al citosol, evitar la degradación intracelular, inactivar catalíticamente los ribosomas y efectuar efectos citostáticos y/o citotóxicos.

[0295] La familia de toxinas proteicas de la toxina Shiga está compuesta de varias toxinas naturales que están relacionadas estructural y funcionalmente, por ejemplo, la toxina Shiga, la toxina similar a Shiga 1 y la toxina similar a Shiga 2 (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Los miembros de la holotoxina de la familia de toxinas Shiga contienen dominios dirigidos que se unen preferentemente a un glucosfingolípido específico presente en la superficie de algunas células huésped y un dominio enzimático capaz de inactivar permanentemente los ribosomas una vez dentro de una célula (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105 -16 (2010)). Los miembros de la familia de toxinas Shiga comparten la misma estructura general y 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., Toxicol 35: 1431-1437 (1997)).

[0296] La familia de toxina Shiga abarca la verdadera toxina Shiga (Stx) aislada de *S. dysenteriae* serotipo 1, variantes de toxina similar a Shiga 1 (SLT1 o Stx1 o SLT-1 o Stx-I) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica, y variantes de toxina similar a Shiga 2 (SLT2 o Stx2 o SLT-2) aisladas de serotipos de *E. coli* enterohemorrágica. SLT1 difiere en un solo residuo de aminoácido de Stx, y ambos se han denominado Verocitotoxinas o Verotoxinas (VT) (O'Brien A, Curr Top Microbiol Immunol 180: 65-94 (1992)). Aunque las variantes SLT1 y SLT2 son solo aproximadamente un 53-60% similares entre sí en el nivel de secuencia de aminoácidos primario, comparten mecanismos de actividad enzimática y citotoxicidad comunes a los miembros de la familia de toxinas Shiga (Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). Se han descrito más de 39 toxinas Shiga diferentes, como los subtipos definidos Stxla, Stxlc, Stxld y Stx2a-g (Scheutz F et al., J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)). Los miembros de la familia de las toxinas Shiga no están restringidos de forma natural a ninguna especie bacteriana porque los genes que codifican la toxina Shiga pueden propagarse entre las especies bacterianas a través de la transferencia horizontal de genes (Strauch E et al., Infect Immun 69: 7588-95 (2001); Bielaszewska M et al., Appl Environ Microbiol 73: 3144-50 (2007); Zhaxybayeva O, Doolittle W, Curr Biol 21: R242-6 (2011)). Como ejemplo de transferencia entre especies, se descubrió una toxina Shiga en una cepa de *A. haemolyticus* aislada de un paciente (Grotiuz G et al., J Clin Microbiol 44: 3838-41 (2006)). Una vez que un polinucleótido que codifica la toxina Shiga ingresa a una nueva subespecie o especie, se presume que la secuencia de aminoácidos de la toxina Shiga es capaz de desarrollar ligeras variaciones de secuencia debido a la deriva genética y/o presión selectiva, manteniendo un mecanismo de citotoxicidad común para los miembros de la familia de toxinas Shiga (ver Scheutz F et al., J Clin Microbiol 50: 2951-63 (2012)).

#### A. Polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga desimmunizados

[0297] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención está desimmunizado, tal como, por ejemplo, en comparación con una toxina Shiga de tipo salvaje, polipéptido de toxina Shiga de tipo salvaje y/o polipéptido efector de toxina Shiga que comprende solo secuencias de polipéptidos de tipo salvaje. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga desimmunizados de la presente invención comprenden cada uno una alteración de al menos una región epitópica, putativa, endógena, para reducir el potencial antigénico y/o inmunogénico del polipéptido efector de la toxina Shiga después de la administración del polipéptido a un cordado. Un polipéptido efector de la toxina Shiga y/o un polipéptido de la subunidad A de la toxina Shiga, ya sea natural o no, pueden ser inmunizados por un procedimiento descrito en este documento, descrito en WO 2015/113005 y/o WO 2015/113007, y/o conocido por el experto, en el que la molécula resultante retiene una o más funciones de la subunidad A de la toxina Shiga.

[0298] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende una alteración de un epítipo o región de epítipo endógeno, tal como, por ejemplo, un epítipo de células B y/o células T CD4+. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende una alteración de al menos una región epítipo endógena descrita en el presente documento, en la que la alteración

reduce el potencial antigénico y/o inmunogénico del polipéptido efector de toxina Shiga después de la administración del polipéptido a un cordado, y en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de exhibir una o más funciones de la subunidad A de la toxina Shiga, tales como, por ejemplo, un nivel significativo de citotoxicidad de la toxina Shiga.

5 [0299] El término "alterado" o "alteración" como se usa en el presente documento con respecto a una región del epítipo se refiere a la delección de al menos un residuo de aminoácido en una región del epítipo, inversión de dos o más residuos de aminoácido donde al menos uno de los residuos de aminoácidos invertidos están en una región del epítipo, inserción de al menos un aminoácido en una región del epítipo, y una sustitución de al menos un residuo  
10 de aminoácido en una región del epítipo. Una alteración de la región del epítipo por mutación incluye sustituciones de aminoácidos por aminoácidos no estándar y/o aminoácidos no naturales. Las regiones del epítipo pueden ser alteradas alternativamente por mutaciones que comprenden la modificación de un aminoácido mediante la adición de una estructura química unida covalentemente que enmascara al menos un aminoácido en una región del epítipo, ver, por ejemplo, PEGilación (ver Zhang C et al., *BioDrugs* 26: 209-15 (2012), adyuvantes de molécula pequeña (Flower D, *Expert Opin Drug Discov* 7: 807-17 (2012) y albuminización específica del sitio (Lim S et al., *J Control Release* 207-93 (2015))

[0300] Ciertas regiones e alteraciones del epítipo se indican en el presente documento con referencia a las posiciones de aminoácidos específicas de las subunidades A de la toxina Shiga nativas proporcionadas en el Listado de secuencias, observando que las subunidades A de la toxina Shiga de origen natural pueden comprender formas precursoras que contienen secuencias señal de aproximadamente 22 aminoácidos en sus extremos amino  
20 terminales que se eliminan para producir subunidades A maduras de toxina Shiga y son reconocibles para el trabajador calificado. Además, ciertas alteraciones de la región del epítipo se indican en el presente documento por referencia a aminoácidos específicos (por ejemplo, S para un residuo de serina) presentes de forma nativa en posiciones específicas dentro de las subunidades A de la toxina Shiga nativas (por ejemplo, S33 para el residuo de serina en la posición 33 del extremo amino) seguido por el aminoácido con el que ese residuo ha sido sustituido en la mutación particular en discusión (por ejemplo, S33I representa la sustitución de aminoácido de isoleucina por serina en el residuo de aminoácido 33 del extremo amino terminal).

[0301] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención comprende una alteración de al menos una región de epítipo proporcionada en este documento (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12). En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención comprende una alteración de al menos una región epítipo descrita en los documentos WO  
30 2015/113005 o WO 2015/113007.

[0302] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención comprende o consiste esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa (por ejemplo, SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2), o SLT-2A (SEQ ID NO: 3)) que comprende al menos una alteración de la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de aminoácidos colocados de forma nativa que consiste en: 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 210-218 de SEQ ID NO: 3; 240-258 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de  
40 SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; y 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o la posición equivalente en un polipéptido de la subunidad A de la toxina Shiga, la subregión del polipéptido efector de la toxina Shiga conservada y/o la secuencia de polipéptido efector de la toxina Shiga no nativa .

[0303] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende o consiste esencialmente en una subunidad A trunca de toxina Shiga. Los truncamientos de las subunidades A de la toxina Shiga pueden dar como resultado la eliminación de una o más regiones del epítipo sin afectar las funciones efectoras de la toxina Shiga. El fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que se muestra que exhibe actividad enzimática significativa fue un polipéptido compuesto por los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy A et al., *Infect Immun* 62: 956-60 (1994)). Truncar el extremo carboxi terminal de SLT-1A, StxA o SLT-2A a los aminoácidos 1-251 elimina dos regiones de epítipo de células B pronosticadas, dos epítipos de células T CD4 positivas (CD4 +) pronosticadas, y un epítipo de células B predicho, discontinuo. Truncar el extremo amino de SLT-1A, StxA o SLT-2A a 75-293 elimina al menos tres regiones de epítipo de células B predichas y tres epítipos de células T CD4 + predichas. Truncar los extremos amino y carboxi terminales de SLT-1A, StxA o SLT-2A a 75-251  
50 elimina al menos cinco regiones de epítipo de células B predichas; cuatro epítipos de células T CD4+ posibles; y un epítipo de células B, predicho, discontinuo.

[0304] En ciertas realizaciones, un polipéptido efector de toxina Shiga de la invención puede comprender o consistir esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o trunca con al menos una mutación, por ejemplo, delección, inserción, inversión o sustitución, en una región del epítipo proporcionada. En ciertas  
55

realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una delección de al menos un aminoácido dentro de la región del epítipo. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una inserción de al menos un aminoácido dentro de la región del epítipo. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una inversión de aminoácidos, en donde al menos un aminoácido invertido está dentro de la región del epítipo. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos comprenden una alteración que comprende una mutación, tal como una sustitución de aminoácidos por un aminoácido no estándar o un aminoácido con una cadena lateral modificada químicamente. Se proporcionan numerosos ejemplos de sustituciones de aminoácidos individuales en los ejemplos a continuación.

[0305] En ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la invención pueden comprender o consistir esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con una o más mutaciones en comparación con la secuencia nativa que comprende al menos una sustitución de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en: A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H y K. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con una sola mutación en comparación con la secuencia nativa en la que la sustitución se selecciona del grupo que consiste en: D a A, D a G, D a V, D a L, D a I, D a F, D a S, D a Q, E a A, E a G, E a V, E a L, E a I, E a F, E a S, E a Q, E a N, E a D, E a M, E a R, G a A, H a A, H a G, H a V, H a L, H a I, H a F, H a M, K a A, K a G, K a V, K a L, K a I, K a M, K a H, L a A, L a G, N a A, N a G, N a V, N a L, N a I, N a F, P a A, P a G, P a F, R a A, R a G, R a V, R a L, R a I, R a F, R a M, R a Q, R a S, R a K, R a H, S a A, S a G, S a V, S a L, S a I, S a F, S a M, T a A, T a G, T a V, T a L, T a I, T a F, T a M, T a S, Y a A, Y a G, Y a V, Y a L, Y a I, Y a F e Y a M.

[0306] En ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la invención comprenden o consisten esencialmente en una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con una o más mutaciones en comparación con la secuencia de residuos de aminoácidos nativa que comprende al menos una sustitución de aminoácido de un residuo inmunogénico y/o dentro de una región de epítipo, en donde al menos una sustitución se produce en el grupo de aminoácidos posicionado de forma nativa seleccionado del grupo que consiste en: 1 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 44 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 46 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 50 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 51 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 54 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 56 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 57 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 84 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 88 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 104 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 105 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 107 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 108 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 111 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 154 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 185 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 198 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 241 de SEQ ID NO: 3; 242 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 248 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de SEQ ID NO: 3; 251 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

[0307] En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la invención comprenden o consisten esencialmente en una Subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con al menos una sustitución de un residuo inmunogénico y/o dentro de una región de epítipo, en los que al menos una sustitución de aminoácido es por un aminoácido no conservador (véase, por ejemplo, la Tabla C, infra) en relación con un aminoácido de origen nativo situado en una de las siguientes posiciones nativas: 1 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 44 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 46 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 50 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 51 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 54 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 56 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 57 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 84 de

SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 88 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 104 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 105 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 107 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 108 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 111 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 154 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 185 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 198 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 241 de SEQ ID NO: 3; 242 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 248 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de SEQ ID NO: 3; 251 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

[0308] En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la invención comprenden o consisten esencialmente en una Subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con al menos una sustitución de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; D6 a A, G, V, L, I, F, S y Q; S8 a A, G, V, I, L, F y M; T8 a A, G, V, I, L, F, M y S; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; T12 a A, G, V, I, L, F, M y S; S33 a A, G, V, L, I, F y M; S43 a A, G, V, L, I, F y M; G44 a A y L; S45 a A, G, V, L, I, F y M; T45 a A, G, V, L, I, F y M; G46 a A y P; D47 a A, G, V, L, I, F, S y Q; N48 a A, G, V, L y M; L49 a A o G; F50 a A, G, V, L, I y T; A51 a V; D53 a A, G, V, L, I, F, S y Q; V54 a A, G y L; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; G56 a A y P; 157 a A, G, M y F; L57 a A, G, M y F; D58 a A, G, V, L, I, F, S y Q; P59 a A, G y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; D94 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R84 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; V88 a A y G; 188 a A, G y V; D94; S96 a A, G, V, I, L, F y M; T104 a A, G, V, I, L, F, M y S; A105 a L; T107 a A, G, V, I, L, F, M y S; S107 a A, G, V, L, I, F y M; L108 a A, G y M; S109 a A, G, V, I, L, F y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; D111 a A, G, V, L, I, F, S y Q; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D141 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G147 a A; V154 a A y G; R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S y Q; L185 a A, G y V; S186 a A, G, V, I, L, F y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S189 a A, G, V, I, L, F y M; D197 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D198 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; C242 a A, G, V y S; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; C262 a A, G, V y S; D264 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

[0309] En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la invención comprenden o consisten esencialmente en una Subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o truncada con al menos una de las siguientes sustituciones de aminoácidos K1A, K1M, T4I, D6R, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, T12K, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, D47G, N48V, N48F, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A o D264A, G264A, T286A y/o T286I. Estas sustituciones que alteran el epítipo pueden combinarse para formar un polipéptido efector de la toxina Shiga desinmunizado con múltiples sustituciones por región epítipo y/o múltiples regiones epítipo alteradas, mientras se conserva la función efectora de la toxina Shiga. Por ejemplo, sustituciones situadas en la posición nativa K1A, K1M, T4I, D6R, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, T12K, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, D47G, N48V, N48F, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, D53G, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A o D264A, G264A, T286A y/o T286I, pueden combinarse, cuando sea posible, con sustituciones en los residuos colocados de forma nativa *K1A, K1M, T4I, D6R, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, T12K, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, D47G, N48V, N48F, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, D53G, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, or D264A, G264A, T286A, y/o T286I* para crear polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados de la invención.

[0310] Cualquiera de las subregiones del polipéptido efector de toxina Shiga desimmunizado y/o mutaciones que alteran el epítipo descritas en el presente documento pueden usarse solas o en combinación con cada realización individual de la presente invención, incluidos los procedimientos de la presente invención.

5

#### B. Polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa

[0311] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende (1) una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 que tiene un extremo carboxi terminal y (2) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región de fragmento de toxina Shiga A1. La mejora de la estabilidad de las conexiones entre el componente de la toxina Shiga y otros componentes de las moléculas de reconocimiento celular, por ejemplo, las regiones de unión a las de reconocimiento celular, puede mejorar sus perfiles de toxicidad después de la administración a los organismos al reducir las toxicidades no específicas causadas por la ruptura de la conexión y pérdida de reconocimiento celular, tal como, por ejemplo, como resultado de proteólisis.

10

15

[0312] Las subunidades A de toxina Shiga de los miembros de la familia de toxina Shiga comprenden un sitio conservado de escisión por furina en el extremo carboxi terminal de sus regiones de fragmento A1 importantes para la función de la toxina Shiga. Los motivos del sitio de escisión por furina y los sitios de escisión por furina pueden ser identificados por el experto utilizando técnicas estándar y/o utilizando la información aquí contenida.

20

[0313] El modelo de citotoxicidad de la toxina Shiga es que el procesamiento proteolítico intracelular de las subunidades A de la toxina Shiga por furina en las células intoxicadas es esencial para 1) la liberación del fragmento A1 del resto de la holotoxina Shiga, 2) el escape del fragmento A1 del retículo endoplásmico al exponer un dominio hidrófobo en el extremo carboxi terminal del fragmento A1, y 3) la activación enzimática del fragmento A1 (ver Johannes L, Römer W, Nat Rev Microbiol 8: 105-16 (2010)). La liberación eficiente del fragmento de la toxina Shiga A1 del fragmento A2 y el resto de los componentes de la holotoxina Shiga en el retículo endoplásmico de las células intoxicadas es esencial para el enrutamiento intracelular eficiente hacia el citosol, la actividad enzimática máxima, la inactivación eficaz del ribosoma y el logro de citotoxicidad óptima, es decir, comparable a una toxina Shiga de tipo salvaje (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/191764 y sus referencias).

25

30

[0314] Durante la intoxicación con toxina Shiga, la subunidad A se escinde proteolíticamente por furina en el enlace carboxi de un residuo de arginina conservado (por ejemplo, el residuo de arginina en la posición 251 en StxA y SLT-1A y el residuo de arginina en la posición 250 en Stx2A y SLT -2A). La escisión por furina de las subunidades A de la toxina Shiga se produce en compartimentos endosómicos y/o de Golgi. La furina es una serina endoproteasa especializada que se expresa en una amplia variedad de tipos de células, en todos los tejidos humanos examinados, y en la mayoría de las células animales. La furina escinde los polipéptidos que comprenden motivos accesibles a menudo centrados en el motivo mínimo, dibásico, consenso R-x-(R/K/x)-R. Las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga comprenden una estructura de bucle extendido conservado, expuesto a la superficie (por ejemplo, 242-261 en StxA y SLT-1A, y 241-260 en SLT-2) con un motivo S-R/Y-x-x-R conservado que es escindido por furina. La estructura de bucle extendido expuesta a la superficie situada en los residuos de aminoácidos 242-261 en StxA es necesaria para la escisión de StxA inducida por furina, incluidas las características que flanquean el motivo mínimo de escisión por furina R-x-x-R.

35

40

[0315] Los motivos de escisión por furina y los sitios de escisión por furina en las subunidades de la toxina Shiga A y los polipéptidos efectores de la toxina Shiga pueden ser identificados por el experto utilizando procedimientos estándar y/o utilizando la información aquí contenida. Furin escinde el motivo mínimo de consenso RxxR (Schalken J et al., J Clin Invest 80: 1545-9 (1987); Bresnahan P et al., J Cell Biol 111: 2851-9 (1990); Hatsuzawa K et al., J Biol Chem 265: 22075-8 (1990); Wise R et al., Proc Natl Acad Sci USA 87: 9378-82 (1990); Molloy S et al., J Biol Chem 267: 16396-402 (1992)) De acuerdo con esto, muchos inhibidores de furina comprenden péptidos que comprenden el motivo RxxR. Un ejemplo de un inhibidor sintético de furina es una molécula que comprende el péptido RVKR (SEQ ID NO: 537) (Henrich S y et al., Nat Struct Biol 10: 520-6 (2003)). En general, se puede predecir que un péptido o proteína que comprende un motivo de aminoácido dibásico accesible a la superficie con dos aminoácidos cargados positivamente, separados por dos residuos de aminoácidos, es sensible a la escisión por furina con escisión que ocurre en el enlace carboxi del último básico aminoácido en el motivo.

45

50

55

[0316] Se han identificado motivos de consenso en sustratos escindidos por furina con cierto grado de especificidad. Se ha descrito un motivo de sitio de escisión por furina que comprende una región de veinte residuos de aminoácidos continuos, que pueden marcarse como P14 a P6 (Tian S et al., Int J Mol Sci 12: 1060-5 (2011)) utilizando la nomenclatura descrita en Schechter I, Berger, A, Biochem Biophys Res Commun 32: 898-902 (1968). De acuerdo con esta nomenclatura, el sitio de escisión por furina está en el enlace carboxi del residuo de aminoácido designado P1, y los residuos de aminoácidos del motivo de escisión por furina están numerados P2, P3, P4, etc., en la dirección que va hacia el término amino de este residuo de referencia P1. Los residuos de aminoácidos del motivo que va hacia el extremo carboxi terminal del residuo de referencia P1 se numeran con la notación principal P2', P3', P4', etc. Utilizando esta nomenclatura, la región P6 a P2' delinea el sustrato central del

60

65

motivo de escisión por furina que está unido por el dominio enzimático de furina. Las dos regiones flanqueantes P14 a P7 y P3 'a P6' a menudo son ricas en residuos polares de aminoácidos para aumentar la accesibilidad al sitio central de escisión por furina situado entre ellas.

5 [0317] Un sitio general de escisión por furina se describe a menudo por el motivo de consenso RxxR que corresponde a P4-P3-P2-P1; donde "R" representa un residuo de arginina (ver Tabla A, supra), un guión "-" representa un enlace peptídico, y una "x" minúscula representa cualquier residuo de aminoácido. Sin embargo, otros  
10 -R (donde una barra diagonal "/" significa "o" y divide residuos de aminoácidos alternativos en la misma posición), que corresponde a P4-P3-P2-P1, porque se observó que la furina tiene una fuerte preferencia por la división de sustratos que contienen este motivo.

15 [0318] Además del sitio mínimo de escisión con furina R-x-x-R, se ha descrito un motivo de escisión con furina más grande con ciertas preferencias de residuos de aminoácidos en ciertas posiciones. Al comparar varios sustratos de furina conocidos, se han caracterizado ciertas propiedades fisicoquímicas para los residuos de aminoácidos en un motivo de sitio de escisión por furina con 20 residuos de aminoácidos de longitud. La región P6 a P2' del motivo de escisión por furina delinea el sitio central de escisión con furina que interactúa físicamente con el dominio enzimático de la furina. Las dos regiones flanqueantes P14 a P7 y P3' a P6' son a menudo hidrófilas, siendo ricas en residuos  
20 polares de aminoácidos para aumentar la accesibilidad superficial del sitio central de escisión por furina situado entre ellas.

25 [0319] En general, la región del motivo de escisión por furina desde la posición P5 a P1 tiende a comprender residuos de aminoácidos con una carga positiva y/o puntos isoeléctricos altos. En particular, la posición P1, que marca la posición de la proteólisis de furina, generalmente está ocupada por una arginina, pero en esta posición pueden aparecer otros residuos de aminoácidos cargados positivamente. Las posiciones P2 y P3 tienden a estar ocupadas por residuos de aminoácidos flexibles, y en particular P2 tiende a estar ocupada por arginina, lisina o, a veces, por residuos de aminoácidos muy pequeños y flexibles como la glicina. La posición P4 tiende a estar ocupada por residuos de aminoácidos cargados positivamente en sustratos de furina. Sin embargo, si la posición P4 está  
30 ocupada por un residuo de aminoácido alifático, entonces la falta de un grupo funcional cargado positivamente puede compensarse con un residuo cargado positivamente situado en la posición(es) P5 y/o P6. Las posiciones P1' y P2' están comúnmente ocupadas por residuos de aminoácidos alifáticos y/o hidrófobos, siendo la posición P1' más comúnmente ocupada por una serina.

35 [0320] Las dos regiones flanqueantes hidrófilas tienden a estar ocupadas por residuos de aminoácidos que son polares, hidrófilos y tienen grupos funcionales de aminoácidos más pequeños; sin embargo, en ciertos sustratos de furina verificados, las regiones flanqueantes no contienen residuos de aminoácidos hidrófilos (véase Tian S, Biochem Insights 2: 9-20 (2009)).

40 [0321] El vigésimo residuo de aminoácido, furina-escisión motivo y furina-sitio de escisión se encuentra en nativos, la toxina Shiga subunidades en la unión entre el fragmento de la toxina A1 de Shiga y el fragmento A2 está bien caracterizado en ciertas toxinas Shiga. Por ejemplo, en StxA (SEQ ID NO: 2) y SLT-1A (SEQ ID NO: 1), este motivo de escisión con furina se posiciona de forma nativa desde L238 a F257, y en SLT-2A (SEQ ID NO: 3), este El motivo de escisión con furina se posiciona de forma nativa desde V237 hasta Q256. Según la homología de aminoácidos, el  
45 experimento y/o los ensayos de escisión por furina descritos en este documento, el experto puede identificar motivos de escisión por furina en otras subunidades de la toxina Shiga A nativas o polipéptidos efectores de la toxina Shiga, donde los motivos son motivos reales de escisión por furina. o se predice que dará como resultado la producción de fragmentos A1 y A2 después de la escisión por furina de esas moléculas dentro de una célula eucariota.

50 [0322] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende (1) un polipéptido derivado del fragmento de toxina Shiga A1 que tiene un extremo carboxi terminal y (2) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal del Shiga polipéptido derivado del fragmento de toxina A1. El término carboxi de un polipéptido derivado del fragmento de la toxina Shiga A1 puede ser identificado por un  
55 experto en la materia mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante el uso de software de alineación de secuencias de proteínas para identificar (i) un motivo de escisión por furina conservado con una toxina Shiga natural, (ii) un bucle extendido expuesto a la superficie conservado con una toxina Shiga natural, y/o (iii) un tramo de residuos de aminoácidos que son predominantemente hidrofóbicos (es decir, un "parche" hidrofóbico) que puede ser reconocido por el sistema ERAD.

60 [0323] Un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa de la presente invención (1) puede carecer por completo de cualquier motivo de escisión por furina en un extremo carboxi terminal de su región de fragmento de toxina Shiga A1 y/o (2) comprende una motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxilo de su región del fragmento de toxina Shiga A1 y/o región derivada del extremo carboxilo de un fragmento de la toxina Shiga A1. Una alteración de un motivo de escisión con furina incluye varias alteraciones a un residuo de  
65 aminoácido en el motivo de escisión con furina, como, por ejemplo, una modificación o modificaciones posteriores a

la traducción, una alteración de uno o más átomos en un grupo funcional de aminoácidos, la adición de uno o más átomos a un grupo funcional de aminoácidos, la asociación a un resto o restos no proteínicos, y/o la unión a un residuo de aminoácido, péptido, polipéptido tal como resultando en una estructura proteica ramificada.

5 [0324] Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa pueden crearse a partir de un polipéptido efector de toxina Shiga y/o polipéptido de la subunidad A de toxina Shiga, ya sea de origen natural o no, utilizando un procedimiento descrito en este documento, descrito en el documento WO 2015/191764, y/o conocido por el experto en la materia, en donde la molécula resultante aún retiene una o más funciones de la subunidad A de la toxina Shiga.

10 [0325] Para los fines de la presente invención con respecto a un sitio de escisión por furina o motivo de escisión por furina, el término "alteración" o "alterado" se refiere a una alteración del sitio de escisión por furina natural y/o escisión por furina motivo, tal como, por ejemplo, una mutación, que da como resultado una reducción en la escisión por furina proximal al extremo carboxi terminal de una región de fragmento de toxina Shiga A1, o región identificable derivada de la misma, en comparación con la escisión por furina de un salvaje subunidad de toxina A tipo Shiga o un polipéptido derivado de una subunidad de toxina Shiga tipo A que comprende solo secuencias de polipéptidos de tipo salvaje. Una alteración de un residuo de aminoácido en el motivo de escisión con furina incluye una mutación en el motivo de escisión con furina, tal como, por ejemplo, una deleción, inserción, inversión, sustitución y/o truncamiento carboxi terminal del motivo de escisión con furina, así como una modificación posterior a la traducción, tal como, por ejemplo, como resultado de la glucosilación, albuminización y similares que implican conjugar o unir una molécula al grupo funcional de un residuo de aminoácido. Debido a que el motivo de escisión por furina está compuesto por aproximadamente veinte residuos de aminoácidos, en teoría, las alteraciones, modificaciones, mutaciones, deleciones, inserciones y/o truncamientos que implican uno o más residuos de aminoácidos de cualquiera de estas veinte posiciones podrían dar como resultado una reducción de la sensibilidad a la escisión por furina (Tian S et al., Sci Rep 2: 261 (2012)). La alteración de un sitio de escisión por furina y/o motivo de escisión por furina puede o no aumentar la resistencia a la escisión por otras proteasas, tales como, por ejemplo, tripsina y proteasas extracelulares comunes en el sistema vascular de mamíferos. El experto en la materia puede probar los efectos de una alteración dada a la sensibilidad de escisión de una proteasa dada usando técnicas conocidas en la técnica.

30 [0326] Para los fines de la presente invención, un "motivo de escisión por furina alterado" es un motivo de escisión por furina que comprende una alteración a uno o más residuos de aminoácidos derivados de la región de 20 residuos de aminoácidos que representa un motivo de escisión por furina conservado encontrado en las subunidades nativas de la toxina Shiga A en la unión entre el fragmento A1 de la toxina Shiga y las regiones del fragmento A2 y posicionadas de tal manera que la escisión por furina de una subunidad A de toxina Shiga da como resultado la producción de los fragmentos A1 y A2; en donde el motivo de escisión por furina alterado exhibe una escisión por furina reducida de una manera reproducible experimentalmente en comparación con una molécula de referencia que comprende una región de fragmento A1 de la toxina Shiga de tipo salvaje fusionada a un polipéptido carboxi terminal de un tamaño lo suficientemente grande como para controlar la escisión por furina usando el ensayo apropiado conocido por el experto trabajador y/o descrito aquí.

45 [0327] Ejemplos de tipos de mutaciones que pueden alterar un sitio de escisión por furina y un motivo de escisión por furina son las deleciones, inserciones, truncamientos, inversiones y/o sustituciones de residuos de aminoácidos, incluidas las sustituciones con aminoácidos no estándar y/o aminoácidos no naturales. Además, los sitios de escisión por furina y los motivos de escisión por furina pueden verse alterados por mutaciones que comprenden la modificación de un aminoácido mediante la adición de una estructura unida covalentemente que enmascara al menos un aminoácido en el sitio o motivo, como por ejemplo, como resultado de la PEGilación, el acoplamiento de adyuvantes de molécula pequeña y/o albuminización específica del sitio.

50 [0328] Si un motivo de escisión por furina se ha alterado por mutación y/o la presencia de residuos de aminoácidos no naturales, ciertos motivos de escisión por furina alterados pueden no ser fácilmente reconocibles como relacionados con cualquier motivo de escisión por furina; sin embargo, el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 será reconocible y definirá dónde se ubicaría el motivo de escisión por furina si no se interrumpiera. Por ejemplo, un motivo de escisión por furina alterado puede comprender menos de los veinte residuos de aminoácidos del motivo de escisión por furina debido a un truncamiento carboxi terminal en comparación con una subunidad A de toxina Shiga y/o un fragmento de toxina Shiga A1.

60 [0329] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende (1) un polipéptido derivado de fragmento de toxina Shiga A1 que tiene un extremo carboxi terminal y (2) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal del Shiga región del polipéptido del fragmento de toxina A1; en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga (y cualquier molécula de reconocimiento celular que lo comprenda) es más resistente a la escisión por furina en comparación con una molécula de referencia, como, por ejemplo, un polipéptido de la toxina Shiga de tipo salvaje que comprende el extremo carboxilo de un fragmento A1 y/o el motivo conservado de escisión por furina entre los fragmentos A1 y A2. Por ejemplo, una reducción en la escisión por furina de una molécula en comparación con una molécula de referencia se puede determinar usando un



ensayo de escisión por furina in vitro descrito en los ejemplos a continuación, realizado usando las mismas condiciones, y a continuación realizando una cuantificación de la densidad de banda de cualquier fragmento resultante de la escisión para medir cuantitativamente el cambio en la escisión por furina.

5 [0330] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga es más resistente a la escisión por furina in vitro y/o in vivo en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje.

10 [0331] En general, la sensibilidad a la escisión de la proteasa de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención se prueba comparándola con la misma molécula que tiene su polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por furina reemplazado por un polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje que comprende un fragmento de toxina Shiga A1. En ciertas realizaciones, las moléculas de la presente invención que comprenden un motivo de escisión por furina alterado exhiben una reducción en la escisión por furina in vitro del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98% o más en comparación con una molécula de referencia que comprende un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje fusionado en su extremo carboxi a un péptido o polipéptido, tal como, por ejemplo, la molécula de referencia SLT-1A-WT::scFv -1 descrito en el Ejemplo 2, a continuación.

20 [0332] Se han descrito varias alteraciones del motivo de escisión por furina. Por ejemplo, mutar las dos argininas conservadas a alaninas en el motivo RxxR mínimo bloqueó completamente el procesamiento por furina y/o proteasas similares a furina (véase, por ejemplo, Duda A et al., *J Virology* 78: 13865-70 (2004)). Debido a que el motivo del sitio de escisión por furina se compone de aproximadamente veinte residuos de aminoácidos, en teoría, ciertas mutaciones que involucran uno o más de cualquiera de estas veinte posiciones de residuos de aminoácidos podrían abolir la escisión por furina o reducir la eficiencia de la escisión por furina (véase, por ejemplo, Tian S et al., *Sci Rep.* 2: 261 (2012)).

25 [0333] En ciertas realizaciones, las moléculas de la presente invención comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga derivado de al menos una Subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga en donde el polipéptido efector de toxina Shiga comprende una alteración en uno o más aminoácidos derivados del bucle conservado, altamente accesible, sensible a la escisión de proteasa de las subunidades de toxina Shiga A. Por ejemplo, en StxA y SLT-1A, este bucle altamente accesible sensible a la proteasa se coloca de forma nativa a partir de los residuos de aminoácidos 242 a 261, y en SLT-2A, este bucle conservado se coloca de forma nativa a partir de los residuos de aminoácidos 241 a 260. Basado En la homología de la secuencia de polipéptidos, el experto puede identificar esta estructura de bucle conservada y altamente accesible en otras subunidades de toxina Shiga A. Ciertas mutaciones en los residuos de aminoácidos en este bucle pueden reducir la accesibilidad de ciertos residuos de aminoácidos dentro del bucle a la escisión proteolítica y esto podría reducir la sensibilidad a la escisión por furina.

40 [0334] En ciertas realizaciones, una molécula de la presente invención comprende un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado que comprende una mutación en el bucle sensible a proteasa expuesto a la superficie conservado entre las subunidades de toxina Shiga A. En ciertas realizaciones adicionales, una molécula de la presente invención comprende un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado que comprende una mutación en este bucle sensible a proteasa de las subunidades de toxina A de Shiga, la mutación que reduce la accesibilidad a la superficie de ciertos aminoácidos residuos dentro del bucle de tal manera que se reduce la sensibilidad de escisión por furina.

45 [0335] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado de un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende una alteración en términos de existencia, posición o grupo funcional de uno o ambos residuos de aminoácidos consenso P1 y P4, tales como, por ejemplo, los residuos de aminoácidos en las posiciones 1 y 4 del motivo de escisión mínima de furina R/YxxR. Por ejemplo, mutar uno o ambos de los dos residuos de arginina en el sitio mínimo de consenso de furina RxxR a alanina alterará un motivo de escisión por furina y evitará la escisión por furina en ese sitio. De manera similar, las sustituciones de residuos de aminoácidos de uno o ambos residuos de arginina en el motivo mínimo de escisión con furina RxxR por cualquier residuo de aminoácido no conservador conocido por el experto reducirá la sensibilidad de la escisión con furina del motivo. En particular, las sustituciones de residuos de aminoácidos de arginina a cualquier residuo de aminoácidos no básico que carece de una carga positiva, como, por ejemplo, A, G, P, S, T, D, E, Q, N, C, I, L, M, V, F, W e Y, darán lugar a un motivo de escisión por furina alterado.

60 [0336] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado de un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende una alteración en la separación entre los residuos de aminoácidos consenso P4 y P1 en términos de que el número de residuos de aminoácidos intermedios es diferente de dos, y, por lo tanto, cambiando P4 y/o P1 a una posición diferente y eliminando las designaciones P4 y/o P1. Por ejemplo, las deleciones dentro del motivo de escisión por furina del sitio mínimo de escisión por furina o el motivo central de escisión por furina reducirán la sensibilidad de escisión por furina del motivo de escisión por furina.

65 [0337] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácidos, en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas

- realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácidos dentro del sitio de escisión por furina mínimo R/YxxR, tales como, por ejemplo, para polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A, los polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA, los colocados de forma nativa residuo de aminoácido R248 sustituido con cualquier residuo de aminoácido sin carga positiva y/o R251 sustituido con cualquier residuo de aminoácido sin carga positiva; y para los polipéptidos efectores de la toxina Shiga derivados de SLT-2A, el residuo de aminoácido Y247 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido sin carga positiva y/o R250 sustituido con cualquier residuo de aminoácido sin carga positiva.
- [0338] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende un sitio de escisión por furina mínimo no alterado R/YxxR pero en cambio comprende una región flanqueante alterada, tal como, por ejemplo, sustituciones de residuos de aminoácidos en uno o más aminoácidos los residuos en las regiones flanqueantes del motivo de escisión con furina se colocan de forma nativa en, por ejemplo, 241-247 y/o 252-259. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una sustitución de uno o más de los residuos de aminoácidos situados en la región P1-P6 del motivo de escisión por furina; mutar P1 'a un aminoácido voluminoso, tal como, por ejemplo, R, W, Y, F y H; y mutar P2 'a un residuo de aminoácido polar e hidrófilo; y sustituyendo uno o más de los residuos de aminoácidos situados en la región P1'-P6 'del motivo de escisión por furina con uno o más residuos de aminoácidos voluminosos e hidrófobos
- [0339] En ciertas realizaciones, la alteración del motivo de escisión con furina comprende una delección, inserción, inversión y/o mutación de al menos un residuo de aminoácido dentro del motivo de escisión con furina. En ciertas realizaciones, un polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión de la proteasa de la presente invención puede comprender una alteración de la secuencia de aminoácidos situada de forma nativa en 249-251 de la Subunidad A de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o en 247-250 de la subunidad A de la toxina tipo Shiga 2 (SEQ ID NO: 3) o la posición equivalente en un polipéptido efector de la toxina Shiga conservado y/o no nativo Secuencia del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa comprenden una alteración que comprende una delección de al menos un aminoácido dentro del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa comprenden una alteración que comprende una inserción de al menos un aminoácido dentro de la región del motivo de escisión por proteasa. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión de la proteasa comprenden una alteración que comprende una inversión de aminoácidos, en donde al menos un aminoácido invertido está dentro de la región del motivo de la proteasa. En ciertas realizaciones adicionales, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión de la proteasa comprenden una alteración que comprende una mutación, tal como una sustitución de aminoácidos por un aminoácido no estándar o un aminoácido con una cadena lateral modificada químicamente. Se proporcionan ejemplos de sustituciones de aminoácidos individuales en los ejemplos a continuación.
- [0340] En ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención, el motivo de escisión por furina alterado comprende la eliminación de nueve, diez, once o más de los residuos de aminoácidos carboxi terminales dentro del motivo de escisión por furina. En estas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado no comprenderá un sitio de escisión por furina o un motivo de escisión mínima de furina. En otras palabras, ciertas realizaciones carecen de un sitio de escisión por furina en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1.
- [0341] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una delección de residuos de aminoácidos como una sustitución de residuos de aminoácidos en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más delecciones y sustituciones de residuos de aminoácidos dentro del sitio mínimo de escisión por furina R/YxxR, tales como, por ejemplo, para polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A, el residuo de aminoácido R248 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente y/o R251 sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente; y para los polipéptidos efectores de la toxina Shiga derivados de SLT-2A, el residuo de aminoácido Y247 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido sin carga positiva y/o R250 sustituido con cualquier residuo de aminoácido sin carga positiva.
- [0342] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una eliminación de residuos de aminoácidos y una sustitución de residuos de aminoácidos, así como un truncamiento carboxi-terminal en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más delecciones y sustituciones de residuos de aminoácidos dentro del sitio de escisión por furina mínimo R/YxxR, tales como, por ejemplo, para polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A, el residuo de aminoácido R248 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente y/o R251 sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente; y para los polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de SLT-2A, el residuo de aminoácido Y247 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente y/o R250 sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente.

[0343] En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una sustitución de aminoácidos dentro del sitio mínimo de escisión por furina R/YxxR como un truncamiento carboxi-terminal en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, para polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A, truncamientos que terminan en la posición de aminoácidos nativa 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291 o superior y que comprende el residuo de aminoácido R248 y/o R251 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente cuando sea apropiado; y para los polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de SLT-2A, truncamientos que terminan en la posición de aminoácidos nativa 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291 o superior y que comprende el residuo de aminoácido Y247 y/o R250 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente cuando sea apropiado.

[0344] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una inserción de uno o más residuos de aminoácidos en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje, siempre que los residuos de aminoácidos insertados no creen sitio de escisión por furina novo. En ciertas realizaciones, la inserción de uno o más residuos de aminoácidos altera la separación natural entre los residuos de arginina en el sitio mínimo de escisión con furina R/YxxR, como, por ejemplo, polipéptidos derivados de StxA y SLT-1A que comprenden una inserción de uno o más residuos de aminoácidos a 249 o 250 y, por lo tanto, entre R248 y R251; o polipéptidos derivados de SLT-2A que comprenden una inserción de uno o más residuos de aminoácidos en 248 o 249 y, por lo tanto, entre Y247 y R250.

[0345] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterada comprende tanto una inserción de residuo de aminoácido como un truncamiento carboxi terminal en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterada comprende tanto una inserción de residuo de aminoácido como una sustitución de residuo de aminoácido en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterada comprende tanto una inserción de residuo de aminoácido como una delección de residuo de aminoácido en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje.

[0346] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una eliminación de residuos de aminoácidos, una inserción de residuos de aminoácidos y una sustitución de residuos de aminoácidos en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje.

[0347] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una delección, inserción, sustitución y truncamiento de carboxi-terminal del residuo de aminoácido en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje.

[0348] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado se fusiona directamente mediante un enlace peptídico a un resto molecular que comprende un aminoácido, péptido y/o polipéptido en el que la estructura fusionada implica un único, continuo polipéptido. En estas realizaciones de fusión, la secuencia de aminoácidos que sigue al motivo de escisión por furina alterado no debería crear un sitio de escisión por furina de novo en la unión de fusión.

[0349] Cualquiera de las subregiones de polipéptido efector de toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa anteriores y/o motivos de escisión por furina alterados se pueden usar solos o en combinación con cada realización individual de la presente invención, incluidos los procedimientos de la presente invención.

#### C. Polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga hiperinmunizados de las células T

[0350] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende un epítipo-péptido integrado o insertado. En ciertas realizaciones adicionales, el péptido-epítipo es un péptido-epítipo de células T heterólogo, tal como, por ejemplo, un epítipo considerado heterólogo a las subunidades de toxina Shiga A. En ciertas realizaciones adicionales, el péptido-epítipo es un epítipo de células T CD8 +. En ciertas realizaciones adicionales, el péptido-epítipo de células T CD8 + tiene una afinidad de unión a una molécula de MHC de clase I caracterizada por una constante de disociación ( $k_D$ ) de  $10^{-4}$  molar o menos y/o el epítipo de MHC de clase I resultante El complejo peptídico tiene una afinidad de unión a un receptor de células T (TCR) caracterizado por una constante de disociación ( $k_D$ ) de  $10^{-4}$  molar o menos.

[0351] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención comprende un epítipo de células T heterólogo, integrado o insertado, tal como, por ejemplo, un epítipo de células T CD8 + humano. En ciertas realizaciones adicionales, el epítipo heterólogo de células T está integrado o insertado para interrumpir un epítipo endógeno o región de epítipo (por ejemplo, un epítipo de células B y/o epítipo de células T

CD4 +) identificable en un polipéptido de toxina Shiga de origen natural. o polipéptido efector de toxina Shiga parental del que se deriva el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención.

[0352] Para ciertas realizaciones de la presente invención, el polipéptido efector de la toxina Shiga (y cualquier molécula de reconocimiento celular que lo comprenda) es una célula T CD8 + hiperinmunizada, como, por ejemplo, en comparación con un polipéptido de la toxina Shiga de tipo salvaje. Los polipéptidos efectores de toxina Shiga hiperinmunizados de células T CD8 + de la presente invención comprenden cada uno un epítipo-péptido de células T integrado o insertado. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga hiperinmunizados se pueden crear a partir de polipéptidos efectores de la toxina Shiga y/o polipéptidos de la subunidad A de la toxina Shiga, ya sea de forma natural o no, utilizando un procedimiento descrito en este documento, descrito en el documento WO 2015/113007, y/o conocido por el experto, en el que la molécula resultante aún retiene una o más funciones de la subunidad A de la toxina Shiga.

[0353] Para los propósitos de la invención reivindicada, un epítipo de células T es una estructura molecular que está compuesta por un péptido antigénico y puede representarse por una secuencia lineal de aminoácidos. Comúnmente, los epítopos de células T son péptidos de tamaños de ocho a once residuos de aminoácidos (Townsend A, Bodmer H, *Annu Rev Immunol* 7: 601-24 (1989)); sin embargo, ciertos péptidos-epítopos de células T tienen longitudes que son menores que ocho o mayores que once aminoácidos de largo (véase, por ejemplo, Livingstone A, Fathman C, *Annu Rev Immunol* 5: 477-501 (1987); Green K et al., *Eur J Immunol* 34: 2510-9 (2004)). En ciertas realizaciones, el epítipo integrado o insertado tiene al menos siete restos de aminoácidos de longitud. En ciertas realizaciones, el epítipo integrado o insertado está unido por un TCR con una afinidad de unión caracterizada por una  $K_D$  inferior a 10 mM (por ejemplo, 1-100  $\mu$ M) calculada usando la fórmula en Stone J et al., *Immunology* 126: 165 -76 (2009). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la afinidad de unión dentro de un intervalo dado entre el epítipo de MHC y el TCR puede no correlacionarse con la antigenicidad y/o inmunogenicidad (véase, por ejemplo, Al-Ramadi B et al., *J Immunol* 155: 662-73 (1995)), como debido a factores como la estabilidad del complejo MHC-péptido-TCR, la densidad del péptido MHC y las funciones independientes de MHC de cofactores de TCR como CD8 (Baker B et al., *Immunity* 13: 475-84 (2000); Hornell T et al., *J Immunol* 170: 4506-14 (2003); Woolridge L et al., *J Immunol* 171: 6650-60 (2003)).

[0354] Un epítipo heterólogo de células T es un epítipo que ya no está presente en una subunidad de la toxina Shiga de tipo salvaje A; una subunidad de la toxina Shiga de origen natural; y/o un polipéptido efector de toxina Shiga parental usado como polipéptido fuente para modificación mediante un procedimiento descrito en este documento, descrito en WO 2015/113007, y/o conocido por el experto.

[0355] Se puede incorporar un epítipo-péptido heterólogo de células T en un polipéptido fuente a través de numerosos procedimientos conocidos por el experto en la materia, que incluyen, por ejemplo, los procesos de creación de una o más sustituciones de aminoácidos dentro del polipéptido fuente, fusionando uno o más aminoácidos al polipéptido fuente, insertando uno o más aminoácidos en el polipéptido fuente, uniendo un péptido al polipéptido fuente, y/o una combinación de los procesos antes mencionados. El resultado de dicho procedimiento es la creación de una variante modificada del polipéptido fuente que comprende uno o más péptidos-epítopos de células T heterólogos integrados o insertados.

[0356] Los epítopos de células T se pueden elegir o derivar de varias moléculas fuente para usar en la presente invención. Los epítopos de células T pueden crearse o derivarse de diversas proteínas naturales. Los epítopos de células T se pueden crear o derivar de diversas proteínas naturales extrañas a los mamíferos, como, por ejemplo, proteínas de microorganismos. Los epítopos de células T pueden crearse o derivarse de proteínas humanas mutadas y/o proteínas humanas expresadas de manera aberrante por células humanas malignas. Los epítopos de células T pueden crearse sintéticamente o derivarse de moléculas sintéticas (véase, por ejemplo, Carbone F et al., *J Exp Med* 167: 1767-9 (1988); Del Val M et al., *J Virol* 65: 3641-6 (1991); Appella E et al., *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1: 177-84 (1995); Perez S et al., *Cancer* 116: 2071-80 (2010)).

[0357] Aunque se contempla que cualquier epítipo-péptido de células T se usa como un epítipo de células T heterólogo de la presente invención, ciertos epítopos pueden seleccionarse en base a propiedades deseables. Un objetivo de la presente invención es crear polipéptidos efectores de la toxina Shiga hiperinmunizados de células T CD8 + para la administración a vertebrados, lo que significa que el epítipo heterólogo de células T es altamente inmunogénico y puede provocar respuestas inmunes robustas in vivo cuando se muestra complejo con una molécula MHC de clase I en la superficie de una célula. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende uno o más epítopos de células T heterólogos, integrados o insertados, que son epítopos de células T CD8 +. Un polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención que comprende un epítipo heterólogo de células T CD8 + se considera un polipéptido efector de la toxina Shiga hiperinmunizado de células T CD8 +.

[0358] Los componentes del epítipo de células T de la presente invención pueden elegirse o derivarse de una serie de moléculas fuente que ya se sabe que son capaces de provocar una respuesta inmune de vertebrados. Los epítopos de células T pueden derivarse de diversas proteínas naturales extrañas a los vertebrados, tales como, por

ejemplo, proteínas de microorganismos patógenos y antígenos cancerosos no propios. En particular, los microorganismos infecciosos pueden contener numerosas proteínas con propiedades antigénicas y/o inmunogénicas conocidas. Además, los microorganismos infecciosos pueden contener numerosas proteínas con subregiones o epítomos antigénicos y/o inmunogénicos conocidos.

5 [0359] Por ejemplo, las proteínas de patógenos intracelulares con huéspedes mamíferos son fuentes de epítomos de células T. Existen numerosos patógenos intracelulares, como virus, bacterias, hongos y eucariotas unicelulares, con proteínas o péptidos antigénicos bien estudiados. Los epítomos de células T pueden seleccionarse o identificarse a partir de virus humanos u otros patógenos intracelulares, tales como, por ejemplo, bacterias como micobacterias, hongos como toxoplasmas y protistas como tripanosomas.

10 [0360] Por ejemplo, hay muchos componentes de péptidos virales inmunogénicos de proteínas virales de virus que son infecciosos para los humanos. Numerosos epítomos de células T humanas se han mapeado a péptidos dentro de proteínas de virus de influenza A, tales como péptidos en las proteínas glicoproteínas HA FE17, S139/1, CH65, C05, hemaglutinina 1 (HA1), hemaglutinina 2 (HA2), no estructural Se ha demostrado que la proteína 1 y 2 (NS1 y NS 2), la proteína matriz 1 y 2 (M1 y M2), la nucleoproteína (NP), la neuraminidasa (NA) y muchos de estos péptidos provocan respuestas inmunitarias humanas, como utilizando un ensayo ex vivo. De manera similar, numerosos epítomos de células T humanas se han mapeado a componentes peptídicos de proteínas de citomegalovirus humanos (HCMV), tales como péptidos en las proteínas pp65 (UL83), UL128-131, inmediato-temprano 1 (IE-1; UL123), se ha demostrado que la glucoproteína B, las proteínas del tegumento y muchos de estos péptidos provocan respuestas inmunes humanas, como mediante el uso de ensayos ex vivo.

15 [0361] Otro ejemplo es que hay muchos antígenos inmunogénicos contra el cáncer en humanos. Los epítomos de células T CD8 + de los antígenos cancerosos y/o de células tumorales pueden ser identificados por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, genómica diferencial, proteómica diferencial, inmunoproteómica, predicción y validación, y enfoques genéticos como el reverso transfección genética (véase, por ejemplo, Admon A et al., *Mol Cell Proteomics* 2: 388-98 (2003); Purcell A, Gorman J, *Mol Cell Proteomics* 3: 193-208 (2004); Comber J, Philip R, *Ther Adv Vaccines* 2: 77-89 (2014)). Hay muchos epítomos de células T antigénicos y/o inmunogénicos ya identificados o que se prevé que ocurran en el cáncer humano y/o las células tumorales. Por ejemplo, se han predicho epítomos de células T en proteínas humanas comúnmente mutadas o sobreexpresadas en células neoplásicas, tales como, por ejemplo, ALK, CEA, N-acetilglucosaminil-transferasa V (GnT-V), HCA587, HER-2/neu, MAGE, Melan-A/MART-1, MUC-1, p53 y TRAG-3 (véase, por ejemplo, van der Bruggen P y otros, *Science* 254: 1643-7 (1991); Kawakami Y y otros, *J Exp. Med* 180: 347-52 (1994); Fisk B et al., *J Exp Med* 181: 2109-17 (1995); Guilloux Y et al., *J Exp Med* 183: 1173 (1996); Skipper J et al., *J Exp Med* 183: 527 (1996); Brossart P et al., 93: 4309-17 (1999); Kawashima I et al., *Cancer Res* 59: 431-5 (1999); Papadopoulos K et al., *Clin Cancer Res* 5: 2089-93 (1999); Zhu B et al., *Clin Cancer Res* 9: 1850-7 (2003); Li B et al., *Clin Exp Immunol* 140: 310-9 (2005); Ait-Tahar K et al., *Int J Cancer* 118: 688-95 (2006); Akiyama Y et al., *Cancer Immunol Immunother* 61: 2311-9 (2012)). Además, se han creado variantes sintéticas de epítomos de células T de células cancerosas humanas (véase, por ejemplo, Lazoura E, Apostolopoulos V, *Curr Med Chem* 12: 629-39 (2005); Douat-Casassus C et al., *J Med Chem* 50: 1598-609 (2007)).

20 [0362] Si bien se puede usar cualquier epítomo de células T en los polipéptidos y moléculas de la presente invención, se pueden preferir ciertos epítomos de células T en función de sus características conocidas y/o determinadas empíricamente. Por ejemplo, en muchas especies, los alelos de MHC en su genoma codifican múltiples variantes moleculares de MHC-I. Debido a que los polimorfismos de la proteína MHC clase I pueden afectar el reconocimiento complejo de antígeno-MHC clase I por las células T CD8 +, los epítomos de células T pueden elegirse para su uso en la presente invención en base al conocimiento sobre ciertos polimorfismos MHC clase I y/o la capacidad de ciertos complejos de antígeno-MHC de clase I para ser reconocidos por las células T que tienen diferentes genotipos.

25 [0363] Hay epítomos peptídicos bien definidos que se sabe que son inmunogénicos, MHC de clase I restringido, y/o que coinciden con una o más variantes específicas de antígeno leucocitario humano (HLA). Para aplicaciones en humanos o que involucren células diana humanas, los expertos capacitados pueden seleccionar o identificar epítomos restringidos a HLA clase I utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica. La capacidad de los péptidos para unirse a las moléculas de MHC de clase I humana se puede usar para predecir el potencial inmunogénico de los supuestos epítomos de células T. La capacidad de los péptidos para unirse a las moléculas de MHC de clase I humana se puede evaluar utilizando herramientas de software. Los epítomos de células T se pueden elegir para usar como un componente de epítomo de células T heterólogo de la presente invención basado en la selectividad peptídica de las variantes de HLA codificadas por los alelos más prevalentes en ciertas poblaciones humanas. Por ejemplo, la población humana es polimórfica para la cadena alfa de las moléculas de MHC de clase I debido a los variados alelos de los genes HLA de individuo a individuo. En ciertos epítomos de células T, una molécula de HLA específica puede presentarla de manera más eficiente, como, por ejemplo, las variantes de HLA comúnmente codificadas por los grupos alelos HLA-A HLA-A2 y HLA-A3.

30 [0364] Cuando se eligen epítomos de células T para su uso como un componente de epítomo de células T heterólogo de la presente invención, se pueden considerar múltiples factores que pueden influir en la generación y transporte de

epítomos a moléculas MHC de clase I receptoras, tales como, por ejemplo, la Presencia y especificidad del epítomo de los siguientes factores en la célula diana: proteasoma, ERAAP/ERAP1, tapasina y TAP.

5 [0365] Al elegir epítomos de células T para usar como un componente de epítomo de células T heterólogo de la presente invención, se puede seleccionar el epítomo que mejor se adapte a las moléculas de MHC de clase I presentes en el tipo de célula o poblaciones de células a las que se dirige. Las diferentes moléculas de MHC de clase I exhiben una unión preferencial a secuencias peptídicas particulares, y los complejos de péptido-MHC de clase I particulares se reconocen específicamente por los receptores de células t (TCR) de las células T efectoras. El experto puede usar el conocimiento sobre las especificidades de la molécula MHC de clase I y las especificidades de TCR para optimizar la selección de epítomos de células T heterólogos utilizados en la presente invención.

15 [0366] Además, los epítomos de células T inmunogénicos múltiples para la presentación de MHC de clase I pueden incrustarse en el mismo polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención, tal como, por ejemplo, para usar en la administración dirigida de una pluralidad de T -epítomos de células simultáneamente. Un ejemplo de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención que comprende múltiples epítomos de células T CD8 + es la SEQ ID NO: 26.

20 [0367] Cualquiera de las subregiones del polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa y/o los motivos de escisión por furina alterada descritos en el presente documento pueden usarse solos o en combinación con cada realización individual de la presente invención, incluidos los procedimientos de la presente invención .

## II Las estructuras generales de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención

25 [0368] Los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención proporcionan armazones robustos y potentes para diseñar moléculas novedosas dirigidas a células. La asociación de las regiones de unión a la orientación celular con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención permite la ingeniería de moléculas terapéuticas y de diagnóstico con características deseables, tales como, por ejemplo, desinmunización, citotoxicidad potente, enrutamiento intracelular eficiente, hiper- células T inmunización, estabilidad molecular y tolerabilidad in vivo a altas dosis.

35 [0369] La presente invención proporciona diversas moléculas de reconocimiento celular, cada una de las cuales comprende (1) una región de unión de reconocimiento celular y (2) un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención pueden asociarse y/o acoplarse a diversos, diversos componentes dirigidos a células (por ejemplo, un resto molecular y/o agente) para crear moléculas de reconocimiento celular de la presente invención. Una molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende (1) una región de unión capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una biomolécula diana y (2) una región de polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención.

40 [0370] Los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención pueden estar unidos a una o más regiones de unión a la orientación celular que median la orientación celular a través de la especificidad de unión a partes extracelulares de biomoléculas diana, tales como, por ejemplo, una biomolécula diana acoplada físicamente a una superficie celular de una célula. Un ejemplo no limitativo de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención es un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención fusionado a una región de unión proteica, de reconocimiento celular, tal como, por ejemplo, una región de unión de tipo inmunoglobulina.

### A. Regiones de unión

50 [0371] En ciertas realizaciones, una región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención es un componente dirigido a la célula, tal como, por ejemplo, un dominio, resto molecular o agente, capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una biomolécula diana (por ejemplo, una biomolécula diana extracelular) con alta afinidad. Existen numerosos tipos de regiones de unión conocidas por el experto o que pueden ser descubiertas por el experto utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, cualquier componente de reconocimiento celular que exhiba las características de unión requeridas descritas en este documento puede usarse como la región de unión en ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención.

60 [0372] Una parte extracelular de una biomolécula diana se refiere a una parte de su estructura expuesta al entorno extracelular cuando la molécula está físicamente acoplada a una célula, como, por ejemplo, cuando la célula expresa la biomolécula diana en una superficie celular. . En este contexto, expuesto al entorno extracelular significa que parte de la biomolécula objetivo es accesible, por ejemplo, mediante un anticuerpo o al menos un resto de unión más pequeño que un anticuerpo, como un dominio de anticuerpo de dominio único, un nanocuerpo, una cadena pesada dominio de anticuerpos derivado de camélidos o peces cartilaginosos, un fragmento variable de cadena sencilla, o cualquier número de andamios alternativos diseñados para inmunoglobulinas (ver más abajo). La

exposición al entorno extracelular o la accesibilidad a una parte de la biomolécula diana físicamente acoplada a una célula puede ser determinada empíricamente por el experto utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica.

[0373] Una región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención puede ser, por ejemplo, un ligando, péptido, región de unión de tipo inmunoglobulina, anticuerpo monoclonal, derivado de anticuerpo modificado por ingeniería genética o una alternativa modificada por ingeniería genética a anticuerpos.

[0374] En ciertas realizaciones, la región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención es un resto proteináceo capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de la biomolécula diana con alta afinidad. Una región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención puede comprender uno o más restos peptídicos o polipeptídicos diferentes, tales como secuencias de péptidos generadas aleatoriamente, ligandos naturales o derivados de los mismos, dominios derivados de inmunoglobulinas, andamios diseñados sintéticamente como alternativas a los dominios de inmunoglobulinas., y similares (ver, por ejemplo, WO 2005/092917; WO 2007/033497; Cheung M et al., Mol Cancer 9: 28 (2010); US 2013/0196928; WO 2014/164693; WO 2015/113005; WO 2015/113007; WO 2015/138452; WO 2015/191764). En ciertas realizaciones, una molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende uno o más polipéptidos capaces de unirse selectiva y específicamente a una biomolécula diana extracelular.

[0375] Existen numerosas regiones de unión conocidas en la técnica que son útiles para dirigir moléculas a tipos de células específicos a través de sus características de unión, tales como ciertos ligandos, anticuerpos monoclonales, derivados de anticuerpos modificados y alternativas modificadas a los anticuerpos.

[0376] Según un aspecto específico pero no limitante, la región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende un ligando natural o derivado del mismo que retiene la funcionalidad de unión a una biomolécula diana extracelular, comúnmente un receptor de superficie celular. Por ejemplo, varias citocinas, factores de crecimiento y hormonas conocidas en la técnica pueden usarse para dirigir la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a la superficie celular de tipos celulares específicos que expresan un receptor de citocina, receptor del factor de crecimiento u hormona afines receptor. Ciertos ejemplos no limitantes de ligandos incluyen (los nombres alternativos se indican entre paréntesis) angiogenina, factores de activación de células B (BAFF, APRIL), factores estimulantes de colonias (CSF), factores de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores de crecimiento similares a la insulina (IGF), interferones, interleucinas (como IL-2, IL-6 e IL-23), factores de crecimiento nervioso (NGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas, transformación factores de crecimiento (TGF) y factores de necrosis tumoral (TNF).

[0377] Según ciertas otras realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un ligando sintético capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular (véase, por ejemplo, Liang S et al., J Mol Med 84: 764-73 (2006); Ahmed S et al., Anal Chem 82: 7533-41 (2010); Kaur K et al., Methods Mol Biol 1248: 239-47 (2015)).

[0378] En ciertas realizaciones, la región de unión comprende un peptidomimético, tal como, por ejemplo, un péptido AA, péptido gamma-AA y/o péptido sulfono-γ-AA (véase, por ejemplo, Pils I, Reiser O, aminoácidos 41: 709- 18 (2011); Akram O et al., Mol Cancer Res 12: 967-78 (2014); Wu H et al., Chemistry 21: 2501-7 (2015); Teng P et al., Chemistry 2016 Mar 4))

[0379] Según un aspecto específico, pero no limitante, la región de unión puede comprender una región de unión de tipo inmunoglobulina. El término "región de unión de tipo inmunoglobulina" 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 pueden definirse 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.

[0380] Las proteínas de inmunoglobulina (Ig) tienen un dominio estructural conocido como dominio de Ig. Los dominios de Ig varían en longitud de aproximadamente 70-110 residuos de aminoácidos y poseen un pliegue de Ig característico, en el que típicamente de 7 a 9 cadenas beta antiparalelas se disponen en dos láminas beta que forman una estructura tipo sándwich. El pliegue de Ig se estabiliza mediante interacciones de aminoácidos hidrófobos en las superficies internas del emparedado y enlaces disulfuro altamente conservados entre los residuos de cisteína en las cadenas. Los dominios de Ig pueden ser variables (conjunto de IgV o V), constantes (conjunto de IgC o C) o intermedios (conjunto de Igl o I). Algunos dominios de Ig pueden estar asociados con una región determinante de complementariedad (CDR), también llamada "región determinante complementaria", que es importante para la especificidad de los anticuerpos que se unen a sus epítopos. Los dominios similares a Ig también se encuentran en proteínas no inmunoglobulínicas y se clasifican sobre esa base como miembros de la superfamilia de proteínas Ig. El Comité de Nomenclatura Genética de HUGO (HGNC) proporciona una lista de miembros de la familia que contiene el dominio de tipo Ig.

[0381] Una región de unión de tipo inmunoglobulina puede ser una secuencia de polipéptidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo en el que la secuencia de aminoácidos se ha variado de la de un anticuerpo nativo o un dominio similar a Ig de una proteína no inmunoglobulina, por ejemplo mediante ingeniería molecular o selección mediante selección de biblioteca. Debido a la relevancia de las técnicas de ADN recombinante y el cribado de la biblioteca in vitro en la generación de regiones de unión de tipo inmunoglobulina, los anticuerpos se pueden rediseñar para obtener las características deseadas, como un tamaño más pequeño, entrada en la célula u otras mejoras para la terapia in vivo y/o terapéutica aplicaciones. Las posibles variaciones son muchas y pueden variar desde el cambio de un solo aminoácido hasta el rediseño completo de, por ejemplo, una región variable. Típicamente, se realizarán cambios en la región variable para mejorar las características de unión al antígeno, mejorar la estabilidad de la región variable o reducir el potencial de respuestas inmunogénicas.

[0382] Existen numerosas regiones de unión de tipo inmunoglobulina contempladas como componentes de la presente invención. En ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina se 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 modificado genéticamente no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión de inmunoglobulina proporcionando unión de alta afinidad a una biomolécula diana extracelular. Este polipéptido modificado genéticamente puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

[0383] También hay numerosas regiones de unión en la técnica anterior que son útiles para dirigir polipéptidos a tipos de células específicos a través de sus características de unión de alta afinidad. En ciertas realizaciones, la región de unión de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención se selecciona del grupo que incluye dominios  $V_H$  autónomos, dominios de anticuerpos de dominio único (sdAbs), dominios de anticuerpos de cadena pesada derivados de camélidos ( $V_H H$  fragmentos o  $V_H$  fragmentos de dominio), los dominios de anticuerpo de cadena pesada de camélidos derivan de  $V_H$  fragmentos  $H$  o  $V_H$  fragmentos de los dominios, dominios de anticuerpo de cadena pesada derivadas de peces cartilaginosos, la inmunoglobulina nuevos receptores de antígenos (IgNARs),  $V_{NAR}$  fragmentos, de un solo fragmentos de cadena variable (scFv), nanocuerpos, fragmentos Fd que consisten en la cadena pesada y los dominios  $C_{H1}$ , minicuerpos Fv- $C_{H3}$  de cadena sencilla, fragmentos de dominio dimericos  $C_{H2}$  ( $C_{H2D}$ ), dominios de unión al antígeno Fc (Fcabs), fragmentos de la región determinante complementaria aislada 3 (CDR3), región marco restringida 3, CDR3, polipéptidos de la región marco 4 (FR3-CDR3-FR4), dominios inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), fusiones scFv-Fc, fragmentos scFv multimerizantes (diabodies, triacuerpos, tetracuerpos), fragmentos variables de anticuerpos estabilizados con disulfuro (Fv), fragmentos de unión a antígeno estabilizados con disulfuro (Fab) que consisten en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_H1$ , nanocuerpos bivalentes, minibodies bivalentes, F bivalente (ab')<sub>2</sub> fragmentos (dímeros Fab), fragmentos biespecíficos de  $V_H H$  en tándem, fragmentos biespecíficos de scFv en tándem, nanocuerpos biespecíficos, minicuerpos biespecíficos y cualquier contraparte manipulada genéticamente de lo anterior que conserve su paratope y su función de unión (ver Ward E et al., Nature 341: 544-6 (1989); Davies J, Riechmann L, Biotechnology (NY) 13: 475-9 (1995); Reiter Y y et al., Mol Biol 290: 685-98 (1999); Riechmann L, Muyldermans S, J Immunol Methods 231: 25-38 (1999); Tanha J y et al., J Immunol Methods 263: 97-109 (2002); Vranken W y et al., Biochemistry 41: 8570-9 (2002); Jespers L y et al., J Mol Biol 337: 893-903 (2004); Jespers L y et al., Nat Biotechnol 22: 1161-5 (2004); Para R et al., J Biol Chem 280: 41395-403 (2005); Saerens D y 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 y et al., Clin Dev Immunol 2012: 980250 (2012)).

[0384] Hay una variedad de regiones de unión que comprenden polipéptidos derivados de las regiones constantes de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, dominios Fc dimericos diseñados, Fcs monoméricos (mFcs), scFv-Fcs,  $V_H H$ -Fcs, dominios  $C_{H2}$ , dominios monoméricos de  $C_{H3s}$  ( $mC_{H3s}$ ), dominios de inmunoglobulina reprogramados sintéticamente 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: 13616-13618 (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: 1977-82 (2014)).

[0385] De acuerdo con ciertas otras realizaciones, la región de unión comprende un andamiaje alternativo diseñado para dominios de inmunoglobulina. Los andamios alternativos diseñados son conocidos en la técnica que exhiben características funcionales similares a las estructuras derivadas de inmunoglobulina, tales como alta afinidad y unión específica de biomoléculas diana, y pueden proporcionar características mejoradas a ciertos dominios de inmunoglobulina, tales como, por ejemplo, mayor estabilidad o reducción inmunogenicidad. Generalmente, los andamios alternativos a las inmunoglobulinas tienen menos de 20 kilodaltons, consisten en una sola cadena de polipéptidos, carecen de residuos de cisteína y exhiben una estabilidad termodinámica relativamente alta.



[0386] Para ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un armazón alternativo seleccionado del grupo que incluye dominios  $V_H$  autónomos, dominios de anticuerpos de dominio único (sdAbs), dominios de anticuerpos de cadena pesada derivados de camélidos (fragmentos  $V_{HH}$  o fragmentos de dominio  $V_H$ ), dominios de anticuerpos de cadena pesada derivados de fragmentos de camélidos  $V_{HH}$  o fragmentos de dominio  $V_H$ , dominios de anticuerpos de cadena pesada derivados de peces cartilagosos, nuevos receptores de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), Fragmentos  $V_{NAR}$ , fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), nanocuerpos, fragmentos Fd que consisten en los dominios de cadena pesada y  $C_{H1}$ , Fvs permutados (pFv), minicuerpos Fv- $C_{H3}$  de cadena sencilla, fragmentos de dominio dimérico  $C_{H2}$  ( $C_{H2D}$ ), dominios de unión al antígeno Fc (Fcabs), fragmentos complementarios aislados de la región determinante 3 (CDR3), región marco restringida 3, CDR3, polipéptidos de la región marco 4 (FR3-CDR3-FR4), domai inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP) ns, fusiones scFv-Fc, fragmentos scFv multimerizantes (diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos), fragmentos variables de anticuerpos estabilizados con disulfuro (Fv), fragmentos de unión a antígeno (Fab) estabilizados con disulfuro que consisten en  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$  dominios, nanocuerpos bivalentes, minibodies bivalentes, fragmentos  $F(ab')_2$  bivalentes (dímeros Fab), fragmentos bifuncionales de  $V_{HH}$  en tándem, fragmentos biespecíficos de scFv en tándem, nanobodies biespecíficos, minibodies biespecíficos y cualquier contraparte manipulada genéticamente de los anteriores que conserva su funcionalidad vinculante (Wörn A, Plückthun A, J Mol Biol 305: 989-1010 (2001); Xu L y et al., Chem Biol 9: 933-42 (2002); Wikman M y et al., Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Binz H y et al., Nat Biotechnol 23: 1257-68 (2005); Hey T et al., Trends Biotechnol 23: 514-522 (2005); Holliger P, Hudson P, Nat Biotechnol 23: 1126-36 (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 y et al., J Biol Chem 285: 12096 (2010); Zoller F y et al., Molecules 16: 2467-85 (2011); Alfarano P y et al., Protein Sci 21: 1298-314 (2012); Madhurantakam C y et al., Protein Sci 21: 1015-28 (2012); Varadamsetty G y et al., J Mol Biol 424: 68-87 (2012); Reichen C y et al., J Struct Biol 185: 147-62 (2014)).

[0387] Por ejemplo, se han identificado numerosos andamios alternativos que se unen al receptor extracelular HER2 (véase, por ejemplo, Wikman M y et al., Protein Eng Des Sel 17: 455-62 (2004); Orlova A y 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 estadounidenses 5,578,482; 5,856,110; 5,869,445; 7.96.000 5,869,445; 5,985,553; 6,333,169; 6,987,088; 7,019,077; 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; solicitud de patente de Estados Unidos 2011/0059090. Además de los formatos de anticuerpos alternativos, los compuestos no proteicos pueden conferir capacidades de unión similares a los anticuerpos, como por ejemplo, oligómeros, moléculas de ARN, moléculas de ADN, carbohidratos y glicocalixcalixarenos (ver, por ejemplo, Sansone F, Casnati A, Chem Soc Rev 42: 4623-39 (2013)) o compuestos parcialmente proteicos, tales como, por ejemplo, oligómeros cíclicos de fenol-formaldehído acoplados con péptidos y composiciones de péptido calixareno (véase, por ejemplo, el documento US 5.770.380).

[0388] Cualquiera de las estructuras de la región de unión anteriores se puede usar como un componente de una molécula de la presente invención siempre que el componente de la región de unión tenga una constante de disociación de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro, preferiblemente menos de 200 nanomolar (nM), hacia una biomolécula diana extracelular.

[0389] En ciertas realizaciones, las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención unido y/o fusionado a una región de unión capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una biomolécula diana o una biomolécula diana extracelular. Las biomoléculas diana extracelulares pueden seleccionarse en base a numerosos criterios, tales como un criterio descrito aquí.

#### B. Biomoléculas diana extracelulares unidas por las regiones de unión

[0390] En ciertas realizaciones, la región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región proteica capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una biomolécula diana o una biomolécula diana extracelular, preferiblemente que está físicamente acoplada a la superficie de un tipo de célula de interés, tal como, por ejemplo, una célula cancerosa, una célula tumoral, una célula plasmática, una célula infectada o una célula huésped que alberga un patógeno intracelular. Las biomoléculas diana unidas por la región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención pueden incluir biomarcadores presentes de forma desproporcionada o exclusiva en células cancerosas, células inmunes y/o células infectadas con patógenos intracelulares, tales como, por ejemplo, virus, bacterias., hongos, priones o protozoos.

[0391] El término "biomolécula diana" se refiere a una molécula biológica, comúnmente una molécula proteica o una proteína modificada por modificaciones postraduccionales, tales como la glicosilación, que está unida por una región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención que da como resultado el

direccionamiento de la molécula de reconocimiento celular a una célula específica, tipo de célula y/o ubicación dentro de un organismo multicelular.

[0392] Para los propósitos de la presente invención, el término "extracelular" con respecto a una biomolécula diana se refiere a una biomolécula que tiene al menos una parte de su estructura expuesta al entorno extracelular. La exposición al entorno extracelular o la accesibilidad a una parte de la biomolécula diana acoplada a una célula puede ser determinada empíricamente por el experto utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de biomoléculas diana extracelulares incluyen componentes de la membrana celular, proteínas que abarcan la transmembrana, biomoléculas ancladas a la membrana celular, biomoléculas unidas a la superficie celular y biomoléculas secretadas.

[0393] Con respecto a la presente invención, la frase "acoplado físicamente" cuando se usa para describir un medio biomolécula diana covalente y/o no covalente intermoleculares interacciones por la biomolécula diana, o una porción del mismo, en el exterior de una célula, tales como una pluralidad de interacciones no covalentes entre la biomolécula objetivo y la célula donde la energía de cada interacción individual es del orden de al menos aproximadamente 1-5 kilocalorías (por ejemplo, enlaces electrostáticos, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, Van der Waals interacciones, fuerzas hidrofóbicas, etc.). Todas las proteínas integrales de membrana se pueden encontrar físicamente acopladas a una membrana celular, así como proteínas de membrana periférica. Por ejemplo, una biomolécula diana extracelular podría comprender una región que abarca la transmembrana, un ancla lipídica, un ancla glucolípida y/o estar asociada de forma no covalente (por ejemplo, a través de interacciones hidrofóbicas no específicas y/o interacciones de unión a lípidos) con un factor que comprende cualquier uno de los anteriores

[0394] Las partes extracelulares de las biomoléculas diana pueden incluir varios epítomos, incluidos polipéptidos no modificados, polipéptidos modificados mediante la adición de grupos funcionales bioquímicos y glucolípidos (véase, por ejemplo, el documento US 5.091.178; EP2431743).

[0395] Las regiones de unión de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden diseñarse o seleccionarse en base a numerosos criterios, tales como la expresión específica del tipo de célula de sus biomoléculas diana, la localización física de sus biomoléculas diana con respecto a tipos de células y/o las propiedades de sus biomoléculas diana. Por ejemplo, ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención comprenden regiones de unión capaces de unirse a biomoléculas diana de la superficie celular que se expresan en una superficie celular exclusivamente por un solo tipo de célula de una especie o solo un tipo de célula dentro de un organismo multicelular. Es deseable, pero no necesario, que una biomolécula diana extracelular se internalice intrínsecamente o se obligue fácilmente a internalizarse al interactuar con una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

[0396] Entre ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión se deriva de un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa o tumoral, donde el antígeno está restringido en expresión a células cancerosas o tumorales (ver Glokler J et al., *Molecules* 15: 2478-90 (2010); Liu Y et al., *Lab Chip* 9: 1033-6 (2009). Según otras realizaciones, la región de unión se selecciona para la unión específica y de alta afinidad a un antígeno de superficie en la superficie celular de una célula cancerosa, donde el antígeno se sobreexpresa o se expresa preferentemente por las células cancerosas en comparación con las células no cancerosas. Algunas biomoléculas diana representativas incluyen, entre otras, las siguientes dianas enumeradas asociadas con cánceres y/o tipos específicos de células inmunes.

[0397] El experto en la materia conoce muchas regiones de unión de tipo inmunoglobulina que se unen con alta afinidad a epítomos extracelulares asociados con células cancerosas, tales como regiones de unión que se unen a cualquiera de las siguientes biomoléculas diana: anexina A1, antígeno de melanoma B3, B4 antígeno de melanoma, CD2, CD3, CD4, CD19, CD20 (proteína de antígeno de linfocitos B CD20), CD22, CD25 (receptor de interleucina-2 IL2R), CD30 (TNFRSF8), CD37, CD38 (ADP ribosa hidrolasa cíclica), CD40, CD44 (receptor de hialuronano), ITGAV (CD51), CD56, CD66, CD70, CD71 (receptor de transferrina), CD73, CD74 (cadena invariante asociada a antígenos HLA-DR), CD79, CD98, endoglina (END, CD105), CD106 (VCAM -1), CD138, receptor de quimiocinas tipo 4 (CD44R-4, fusina, CD184), CD200, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (CD221), mucina1 (MUC1, CD227, CA6, CanAg), molécula de adhesión celular basal (B -CAM, CD239), CD248 (endosialina, TEM1), receptor del factor de necrosis tumoral 10b (TNFRSF10B, CD262), receptor del factor de necrosis tumoral 13B (TNFRSF13B, TAIC, CD276), vas receptor de factor de crecimiento endotelial celular 2 (KDR, CD309), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM, CD326), receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2, Neu, ErbB2, CD340), antígeno de cáncer 15-3 (CA15-3), cáncer antígeno 19-9 (CA 19-9), antígeno de cáncer 125 (CA125, MUC16), CA242, moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (p. ej. CEACAM3 (CD66d) y CEACAM5), proteína de antígeno carcinoembrionario (CEA), tipo transportador de colina proteína 4 (SLC44A4), proteoglicano de sulfato de condroitina 4 (CSP4, MCSP, NG2), CTLA4, proteínas similares a delta (por ejemplo, DLL3, DLL4), proteínas de pirofosfatasa/fosfodiesterasa de ectonucleótidos (por ejemplo, ENPP3), receptores de endotelina (ETBR), factor de crecimiento epidérmico receptor (EGFR, ErbB1), receptores de folato (FOLR, p. ej. FRα), G-28, gangliósido GD2, gangliósido GD3, HLA-Dr10, HLA-DRB, receptor 1 del factor de

5 crecimiento epidérmico humano (HER1), HER3/ErbB-3, Ephrin type-B receptor 2 (EphB2), molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM), proteína de activación de fibroblastos (FAP/seprasa), guanilil ciclasa c (GC C), receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1R), receptor de interleucina 2 (IL-2R), receptor de interleucina 6 (IL-6R), integrinas alfa-V beta-3 ( $\alpha v \beta 3$ ), integrinas alfa-V beta-5 ( $\alpha v \beta 5$ ), integrinas alfa-5 beta-1 ( $\alpha 5 \beta 1$ ), L6, transportador de zinc (LIV-1), MPG, proteína antigénica asociada al melanoma 1 (MAGE-1), antígeno asociado al melanoma 3 (MAGE-3), mesotelina (MSLN), metaloreductasa STEAP1, MPG, MS4A, NaPi2b, nectinas (p. Ej., Nectina-4), p21, p97, receptor de virus de la polio tipo 4 (PVRL4), receptores activados por proteasa (como PAR1), proteínas de antígeno de membrana específicas de próstata (PSMA), SLIT y proteínas similares a NTRK (por ejemplo, SLITRK6), antígeno Thomas-Friedenreich, glucoproteína transmembrana (GPNMB), glucoproteínas trofoblásticas (TPGB, 5T4, WAIF1) y calcio asociado a tumores transductores de señal (TACSTD, por ejemplo, Trop-2, EGP-1, etc.) (ver, por ejemplo, Lui B et al., *Cancer Res* 64: 704-10 (2004); Novellino L y et al., *Cancer Immunol Immunother* 54: 187-207 (2005); Bagley R y et al., *Int J Oncol* 34: 619-27 (2009); Gerber H et al., *MAbs* 1: 247-53 (2009); Beck A y et al., *Nat Rev Immunol* 10: 345-52 (2010); Andersen J y et al., *J Biol Chem* 287: 22927-37 (2012); Nolan-Stevaux O et al., *PLoS One* 7: e50920 (2012); Rust S et al., *Mol Cancer* 12: 11 (2013)). Esta lista de biomoléculas diana está destinada a ser no limitativa. El experto en la materia apreciará que cualquier biomolécula diana deseada asociada con una célula cancerosa u otro tipo de célula deseada puede usarse para diseñar o seleccionar una región de unión que pueda ser adecuada para su uso como un componente de una molécula de reconocimiento celular del presente invención

20 [0398] Los ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con células cancerosas y están unidas con alta afinidad por una región de unión de tipo inmunoglobulina conocida incluyen proteínas BAGE (antígenos de melanoma B), moléculas de adhesión de células basales (BCAM o glucoproteínas del grupo sanguíneo luterano), antígeno tumoral de vejiga (BTA), antígeno de testículo de cáncer NY-ESO-1, proteínas LAGE de antígeno de testículo de cáncer, CD19 (proteína de antígeno de linfocitos B CD19), CD21 (receptor 2 del complemento o receptor 3d del complemento), CD26 (dipeptidil peptidasa-4, DPP4 o proteína complejante de adenosina desaminasa 2), CD33 (lectina-3 de inmunoglobulina de unión a ácido siálico), CD52 (antígeno CAMPATH-1), CD56, CS1 (número de familia SLAM 7 o SLAMF7), célula proteína de antígeno de superficie A33 (gpA33), proteínas de antígeno del virus de Epstein-Barr, proteínas GAGE / PAGE (melanoma asociado a antígenos de cáncer/testículo), receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFR o c-Met), proteínas MAGE, antígeno de melanoma reconocido por las células T 1 proteína (MART-1/MelanA, MARTI), mucinas, Preferentes Proteínas de antígeno de melanoma expresadas por aliado (PRAME), proteína de antígeno prostático específico (PSA), proteína de antígeno de células madre de próstata (PSCA), receptor para end productos de glicación avanzada (RAGE), glucoproteína 72 asociada a tumor (TAG-72), crecimiento endotelial vascular receptores de factor (VEGFR) y antígeno tumoral de Wilms.

35 [0399] Ejemplos de otras biomoléculas diana que están fuertemente asociadas con las células cancerosas son anhidrasa carbónica IX (CA9/CAIX), proteínas claudina (CLDN3, CLDN4), receptor 3 de efrina tipo A (EphA3), proteínas de unión a folato (FBP), gangliósido GM2, receptores del factor de crecimiento similar a la insulina, integrinas (como CD11a-c), receptor del activador del factor nuclear kappa B (RANK), receptor proteína tirosina quinasa erb-3, receptor del factor de necrosis tumoral 10A (TRAIL-R1/DR4), receptor del factor de necrosis tumoral 10B (TRAIL-R2), tenascina C y CD64 (Fc $\gamma$ PI) (ver Hough C et al., *Cancer Res* 60: 6281-7 (2000); Thepen T et al., *Nat Biotechnol* 18: 48-51 (2000); Pastan I et al., *Nat Rev Cancer* 6: 559-65 (2006); Pastan, *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 pretende no ser limitativa.

45 [0400] Además, existen numerosos otros ejemplos de biomoléculas diana contempladas, tales como, por ejemplo, metaloproteinasas 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 de región de c-abl del grupo de punto de ruptura (BCR-ABL), C3aR (componente del complemento 3a receptores), CD7, CD13, CD14, CD15 (Lewis X o antígeno embrionario específico del estadio 1), CD23 (FC epsilon RII), CD45 (receptor de proteína tirosina fosfatasa tipo C), CD49d, CD53, CD54 (molécula de adhesión intercelular 1), CD63 (tetraspanina), CD69, CD80, CD86, CD88 (componente 1 del receptor 5a del complemento), CD115 (receptor del factor estimulante de colonias 1), IL-1R (receptor de interleucina-1), CD123 (receptor de interleucina-3), CD129 (receptor de interleucina 9), CD183 (quimiocina receptor CXCR3), CD191 (CCR1), CD193 (CCR3), CD195 (receptor de quimiocinas CCR5), CD203c, CD225 (proteína transmembrana inducida por interferón 1), CD244 (receptor de células asesinas naturales 2B4), C D282 (receptor tipo Toll 2), CD284 (receptor tipo Toll 4), CD294 (GPR44), CD305 (receptor tipo inmunoglobulina asociada a leucocitos 1), receptor 2 de efrina tipo A (EphA2), Fc $\epsilon$ R1a, galectina-9, proteína del antígeno alfa-fetoproteico 17-A1, aspartil humano (asparaginil) beta-hidroxilasa (HAAH), transcripción similar a la inmunoglobulina ILT-3, lisofosfatidilglicerol aciltransferasa 1 (LPGAT1/IAA0205), proteínas de membrana asociadas al lisosoma (LAMP7, tales como CD10, como), proteína de melanocitos PMEL (gp100), proteína 14 relacionada con mieloides (mrp-14), ligandos NKG2D (p. ej., MICA, MICB, ULBP1, ULBP2, proteínas de unión a UL-16, H-60, Rae-1 y homólogos de los mismos), receptor proteína tirosina quinasa erbB-3, proteínas SART, receptores captadores (como CD64 y CD68), Siglecs (lectinas de tipo inmunoglobulina fijadora de ácido siálico), sindecanos (como SDC1 o CD138), tirosinasa, tirosinasa relacionada con la proteína 1 (TRP-1), la proteína 2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2), el antígeno asociado a la tirosinasa (TAA), APO-3, BCMA, CD2,

5 CD3, CD4, CD8, CD18, CD27, CD28, CD29, CD41, CD49, CD90, CD95 (Fas), CD103, CD104, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD152 (CTLA-4), receptores de quimiocinas, proteínas del complemento, receptores de citocinas, proteínas de histocompatibilidad, ICOS, interferón- alfa, interferón-beta, c-myc, osteoprotegerina, PD-1, RANK, TAIC, miembro de la superfamilia del receptor de TNF (TNF-R1, TNFR-2), Apo2/TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-R3 y TRAIL -R4 (ver Scott A et al., Cancer Immunity 12: 14 (2012); Cheever M et al., Clin Cancer Res 15: 5323-37 (2009)), para las biomoléculas diana y tenga en cuenta que las biomoléculas diana descritas allí son ejemplos no limitantes).

10 [0401] En ciertas realizaciones, la región de unión comprende o consiste esencialmente en una región de unión de tipo inmunoglobulina capaz de unirse específicamente con alta afinidad a la superficie celular de un tipo de célula del sistema inmune. Por ejemplo, se conocen dominios de unión de tipo inmunoglobulina que se unen a factores de la superficie de células inmunitarias, tales como, por ejemplo, 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, 15 CD62, CD66, CD95, CD117, CD123, CD235, CD146, CD326, receptor de interleucina-1 (IL-1R), receptor de interleucina-2 (IL-2R), receptor del activador del factor nuclear kappa B (RANKL), proteína asociada a SLAM (SAP) y TNFSF18 (ligando 18 de factor de necrosis tumoral o GITRL).

20 [0402] Para más ejemplos de biomoléculas diana y regiones de unión previstas para su uso en las moléculas de la presente invención, véanse WO 2005/092917, WO 2007/033497, US2009/0156417, JP4339511, EP1727827, DE602004027168, EP1945660, JP4934761, EP2228383, US2013/0196928, WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, US20150259428, 62/168,758, 62/168,759, 62/168,760, 62/168,761, 62/168,762, 62/168,763 y PCT/US2016/016580.

25 [0403] El experto en la materia entenderá que cualquier biomolécula diana deseada puede usarse para diseñar o seleccionar una región de unión adecuada para asociarse y/o acoplarse con un polipéptido efector de toxina Shiga para producir una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

30 [0404] Cualquiera de las regiones de unión anteriores descritas en el presente documento se puede usar sola o en combinación con cada realización individual de la presente invención, incluidos los procedimientos de la presente invención.

35 [0405] La estructura general de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención es modular, en que varias regiones de unión de reconocimiento celular diversas pueden estar asociadas con diversos polipéptidos efectoras de toxina Shiga de la presente invención para crear diferentes moléculas de reconocimiento celular de la presente invención que exhiben diferencias en sus actividades de reconocimiento celular debido a diferencias en sus regiones de unión. Esto permite que una variedad de actividades de reconocimiento celular sean exhibidas por diferentes realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención de tal manera que diferentes realizaciones se dirijan a diferentes tipos de células con funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como, por ejemplo, citostasis, citotoxicidad y suministro intracelular de materiales exógenos. Además, ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención exhiben ciertas características debido a diferencias en sus respectivas regiones de polipéptidos efectores de toxina Shiga, tales como, por ejemplo, 40 baja antigenicidad y/o inmunogenicidad cuando se administran a un cordado, resistencia a la escisión proteolítica. por ciertas proteasas, alta estabilidad cuando se administran a un organismo multicelular, tolerabilidad in vivo a altas dosis, capacidad de administrar una carga a una ubicación intracelular y/o capacidad de administrar un epítipo de células T a una molécula MHC de clase I para su presentación en una superficie celular.

50 [0406] Para los fines de la presente invención, el orden u orientación específicos de la región del polipéptido efector de toxina Shiga y la región de unión de reconocimiento celular no están fijados entre sí o dentro de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a menos que se indique expresamente. Por ejemplo, cuando la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es una proteína de fusión con uno o varios extremos amino terminales y uno o varios extremos carboxi terminales, pueden ser adecuadas varias disposiciones de los componentes de la invención (véase, por ejemplo, la Figura 1). En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la disposición de sus componentes en relación entre sí o dentro de 55 la molécula de reconocimiento celular está limitada como se describe aquí. Por ejemplo, ciertos motivos de señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico se colocan habitualmente en un extremo carboxi terminal de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención y/o un extremo carboxi terminal de un componente proteico de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

#### 60 C. Motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico de un miembro de la familia KDEL

[0407] Ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención comprenden uno o más motivos de señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi-terminal de un miembro de la familia KDEL. Cualquier motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico descrito en el documento 65 WO 2015/138435 puede ser adecuado para su uso como un componente de ciertas moléculas de reconocimiento

celular de la presente invención.

[0408] Para los propósitos de la presente invención, la frase "motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico", motivo señal de tipo KDEL, o motivo señal se refiere a cualquier miembro de la familia KDEL capaz de funcionar dentro de una célula eucariota para promover la localización subcelular de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención o componente de la misma al retículo endoplásmico a través de receptores KDEL.

[0409] La secuencia carboxi terminal de lisina-asparagina-glutamato-leucina (KDEL) (SEQ ID NO: 514) es un motivo señal de retención y recuperación de retículo endoplásmico canónico para proteínas solubles en células eucariotas y es reconocido por los receptores KDEL (véase, Capitani M, Sallese M, FEBS Lett 583: 3863-71 (2009), para revisión). La familia KDEL de motivos de señal incluye muchos motivos similares a KDEL, tales como HDEL (SEQ ID NO: 515), RDEL (SEQ ID NO: 516), WDEL (SEQ ID NO: 517), YDEL (SEQ ID NO: 518), HEEL (SEQ ID NO: 519), KEEL (SEQ ID NO: 520), REEL (SEQ ID NO: 521), KFEL (SEQ ID NO: 522), KIEL (SEQ ID NO: 523), DKEL (SEQ ID NO: 524), KKEL (SEQ ID NO: 525), HNEL (SEQ ID NO: 526), HTEL (SEQ ID NO: 527), KTEL (SEQ ID NO: 528) y HVEL (SEQ ID NO: 529), todos los cuales se encuentran en los extremos carboxi terminales de proteínas que se sabe que son residentes del lumen del retículo endoplásmico de múltiples reinos filogenéticos (Munro S, Pelham H, Cell 48: 899-907 (1987); Raykhel I et al., J Cell Biol 179: 1193-204 (2007)). La familia de motivos de señal KDEL incluye al menos 46 variantes de polipéptidos que se muestran usando construcciones sintéticas (Raykhel, J Cell Biol 179: 1193-204 (2007)). Los motivos de señal KDEL adicionales incluyen ALEDEL (SEQ ID NO: 530), HAEDEL (SEQ ID NO: 531), HLEDEL (SEQ ID NO: 532), KLEDEL (SEQ ID NO: 533), IRSDEL (SEQ ID NO: 534), ERSTEL (SEQ ID NO: 535) y RPSTEL (SEQ ID NO: 536) (Alanen H et al., J Mol Biol 409: 291-7 (2011)). Un motivo de consenso generalizado que representa la mayoría de los motivos de señal KDEL se ha descrito como [KRHQSA] - [DENQ]-E-L (Hulo N et al., Nucleic Acids Res 34: D227-30 (2006)).

[0410] Las proteínas que contienen motivos de señal de la familia KDEL están unidas por receptores KDEL distribuidos por todo el complejo de Golgi y transportados al retículo endoplasmático por un mecanismo dependiente de microtúbulos para su liberación en el lumen del retículo endoplasmático (Griffiths G et al., J Cell Biol 127: 1557-74 (1994); Miesenböck G, Rothman J, J Cell Biol 129: 309-19 (1995)). Los receptores KDEL realizan un ciclo dinámico entre el complejo de Golgi y el retículo endoplásmico (Jackson M et al., EMBO J. 9: 3153-62 (1990); Schutze M et al., EMBO J. 13: 1696-1705 (1994)).

[0411] Para los fines de la presente invención, los miembros de la familia KDEL incluyen motivos de señal sintéticos capaces de funcionar dentro de una célula eucariota para promover la localización subcelular de una proteína en el retículo endoplásmico a través de receptores KDEL. En otras palabras, algunos miembros de la familia KDEL pueden no existir en la naturaleza o aún no se han observado en la naturaleza, pero el experto puede construirlos y verificarlos empíricamente utilizando procedimientos conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Raykhel I y et al., J Cell Biol 179: 1193-204 (2007).

[0412] Como componente de ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, el motivo de señal de tipo KDEL está físicamente situado, orientado o dispuesto dentro de la molécula de reconocimiento celular de manera que está en un extremo carboxi terminal de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

[0413] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión y la región del polipéptido efector de toxina Shiga, y/o el motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico pueden estar directamente unidos entre sí y/o adecuadamente unidos entre sí a través de uno o más componentes que intervienen, como con uno o más enlazadores bien conocidos por el experto y/o descritos aquí.

#### D. Materiales exógenos adicionales

[0414] En ciertas realizaciones, las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención comprenden un material exógeno adicional. Un "material exógeno adicional", como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más átomos o moléculas, a menudo generalmente no presentes tanto en toxinas Shiga como en células diana nativas, donde la molécula de reconocimiento celular de la presente invención puede usarse para transportar específicamente dicho material a El interior de una célula. En cierto sentido, toda la molécula de reconocimiento celular de la invención es un material exógeno que entrará en la célula; por lo tanto, los materiales exógenos "adicionales" son materiales heterólogos unidos a, pero que no son la molécula central que se dirige a la célula. Ejemplos no limitantes de materiales exógenos adicionales son radionucleidos, péptidos, agentes promotores de detección, proteínas, agentes quimioterapéuticos de moléculas pequeñas y polinucleótidos.

[0415] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, el material exógeno adicional es uno o más radionucleidos, tales como, por ejemplo, <sup>211</sup>At, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>32</sup>P, <sup>60</sup>C, y/o isótopos radiactivos de lutecio.

[0416] En ciertas realizaciones, el material exógeno adicional comprende un péptido, polipéptido o proteína proapoptótico, tal como, por ejemplo, BCL-2, caspasas (por ejemplo, fragmentos de caspasa-3 o caspasa-6), citocromos, granzima B, apoptosis -inducing factor (AIF), BAX, tBid (truncated Bid) y fragmentos proapoptóticos o derivados de los mismos (ver, por ejemplo, Ellerby H et al., *Nat Med* 5: 1032-8 (1999); Mai J et al., *Cancer Res* 61: 7709-12 (2001); Jia L et al., *Cancer Res* 63: 3257-62 (2003); Liu Y et al., *Mol Cancer Ther* 2: 1341-50 (2003); Perea S et al., *Cancer Res* 64: 7127-9 (2004); Xu Y et al., *J Immunol* 173: 61-7 (2004); Dälken B et al., *Cell Death Differ* 13: 576-85 (2006); Wang T et al., *Cancer Res* 67: 11830-9 (2007); Kwon M et al., *Mol Cancer Ther* 7: 1514-22 (2008); Qiu X et al., *Mol Cancer Ther* 7: 1890-9 (2008); Shan L et al., *Cancer Biol Ther* 11: 1717-22 (2008); Wang F et al., *Clin Cancer Res* 16: 2284-94 (2010); Kim J et al., *J Virol* 85: 1507-16 (2011)).

[0417] En ciertas realizaciones, el material exógeno adicional comprende una proteína o polipéptido que comprende una enzima. En ciertas otras realizaciones, el material exógeno adicional es un ácido nucleico, tal como, por ejemplo, un ácido ribonucleico que funciona como un pequeño ARN inhibidor (ARNip) o microARN (miARN). En ciertas realizaciones, el material exógeno adicional es un antígeno, tal como antígenos derivados de patógenos, proteínas bacterianas, proteínas virales, proteínas mutadas en cáncer, proteínas expresadas de manera aberrante 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. Los materiales exógenos que comprenden polipéptidos o proteínas pueden comprender opcionalmente uno o más antígenos, ya sean conocidos o desconocidos por el experto en la materia.

[0418] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, todos los antígenos heterólogos y/o epítopos asociados con el polipéptido efector de toxina Shiga están dispuestos en la molécula de reconocimiento celular amino-terminal al carboxi-terminal de Shiga región de fragmento de toxina A1 del polipéptido efector de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, todos los antígenos y/o epítopos heterólogos asociados con el polipéptido efector de la toxina Shiga están asociados, directa o indirectamente, con el polipéptido efector de la toxina Shiga en una posición amino-terminal al extremo carboxi terminal de la región del fragmento A del polipéptido efector de toxina Shiga. En ciertas realizaciones adicionales, todo el material o materiales exógenos adicionales que es un antígeno está dispuesto en el extremo amino terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga, tal como, por ejemplo, fusionado directa o indirectamente al extremo amino del polipéptido efector de la toxina Shiga.

[0419] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, el material exógeno adicional es un agente citotóxico, tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico de molécula pequeña, agente antineoplásico, antibiótico citotóxico, agente alquilante, antimetabolito, inhibidor de topoisomerasa y/o inhibidor de tubulina. Ejemplos de agentes citotóxicos adecuados para su uso con la presente invención no limitantes incluyen aziridinas, cisplatins, tetracinas, procarbazona, hexametilmelamina, vinca alcaloides, taxanos, camptotecinas, etopósido, doxorubicina, mitoxantrona, tenipósido, novobiocina, aclarrubicina, antraciclina, actinomicina, amanitin, anotrac (5-FU), capecitabina, mitomicina C, paclitaxel, 1,3-Bis (2-cloroetil) -1-nitrosourea (BCNU), rifampicina, cisplatino, metotrexato, gemcitabina, aceglaton, acetogeninas (por ejemplo, bullatacina y bullatacinona), aclacinomisinas, AG1478, AG1571, glucósido de alofosfamida, alquil sulfonatos (por ejemplo, busulfano, improsulfán y piposulfán), agentes alquilantes (por ejemplo, tiotepa y ciclofosfamida), ácido aminolevulínico, aminopterina, amsacrina, ancitabina, antramincina, arabinósido, azacitidina, azaserina, aziridinas (p. ej., benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa), azauridina, bestabucil, bisant, azufre, bisant, azufre, bisant, bisant, azufre criostatina, cactinomicina, callystatina, carabicina, carminomicina, carmofur, carmustina, carzinofilina, CC-1065, clorambucilo, cloranbucilo, clomafazina, clorozotocina, cromomicosis, cromoproteína enediyne antibiótico cromófora, criptocifos, criptocifos, citarabina, dacarbazona, dactinomicina, daunomicina, defofamina, demecolcina, detorubicina, diaziquona, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, didesoxiuridina, difluorometlororitina (DMFO), doxorforo, anocoroforo, anocoroforo, anoforofofo, anoforofofo, anoforofofo, anoforofofo, anoforofofo, anoforofofo, anoforínico y desoxicodrubicina), dinemicinas, edatraxato, edatraxato, eleuterobinas, elformitina, acetato de elliptinio, enediyne e antibióticos (p. ej., calicheamicinas), eniluracilo, enocitabina, epirubicinas, epotilona, esorubicinas, esperamicinas, estramustina, etileniminas, 2-etilhidrazida, etoglucid, fludarabina, análogos de ácido fólico (p. ej., denopterina, metotrexato, trimetropina, trimeropina, trimeropina, trimetropina, trimetropina, trimetrofenato de trimeterina, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos, trimetrofenatos y análogos de trimetropina, trimetrofenato de trimerato, trimetrofenato de ácido fólico y trimetrofenato de ácido fólico. (p. ej., ácido frolínico), fotemustina, fulvestrant, gacitosina, nitrato de galio, gefitinib, gemcitabina, hidroxiurea, ibandronato, ifosfamida, mesilato de imatinib, erlotinib, fulvestrant, letrozol, PTK787/ZK 222584 (Novartis, basalina, CHA) Fracta, Tio novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida y mostaza de uracilo), nitrosourea s (por ejemplo, carmustina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina), dynemicins, cromóforos neocarzinostatina, detorubicina, epirubicins, marcellomycins, mitomicinas (por ejemplo mitomicina C), ácido micofenólico, nogalamycins, olivomicinas, peplomycins, potfiryomycins, puromycins, quelamycins, rodorubicins, ubenimex, zinostatinas, zorubicinas, análogos de purina (p. ej., fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina y tioguanina), análogos de pirimidina (p. ej., ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, didesoxiuridina, doxifluridina, lexifluridina, lexifluridina, lexifluridina, lexiflurida, lonidainina, maytansinoides (p. ej., maytansinas y ansamitocinas),

mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, phenamet, pirarubicina, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, rizoxina, sizofurano, espirogeronio, truzónico, 2,2', truzónico tricloretotrietilamina, tricotecenos (p. ej., toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina), uretano, vindesina, mannomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, arabinoside, ciclofosfamida, toxoides (p. ej., paclitaxel y doxetaxel), 6-tioguanina, mercaptopurina, platino, análogos de platino (p. ej., cisplatino y carboplatino), etopósido (VP-16), mitoxantrona, vinorelbina, novantrona, daunomicina, inhibidor de xeloda RF, topoisome, inhibidor de xeloda, retinoides (p. ej., ácido retinoico), capecitabina, lomustina, losoxantrona, mercaptopurinas, nimustina, nitraerina, razoxano, roridina A, espongiestatinas, estreptonigrinas, estreptozocinas, sutent, toxina T-2, tiamiprina, tóxicos, títeo, títeo, títeo, títeo, títeo y títeo tubercidinas, verracurina A, vinblastina, vincristina y análogos estructurales de cualquiera de los mencionados anteriormente (p. ej., análogos sintéticos) y/o derivados de cualquiera de los mencionados anteriormente (véase, por ejemplo, Lindell T et al., Science 170: 447-9 (1970); Remillard S y et al., Science 189: 1002-5 (1975); Ravry M y et al., Am J Clin Oncol 8: 148-50 (1985); Ravry M y et al., Cancer Treat Rep 69: 1457-8 (1985); Sternberg C y et al., Cancer 64: 2448-58 (1989); Bai R y et al., Biochem Pharmacol 39: 1941-9 (1990); Boger D, Johnson D, Proc Natl Acad Sci USA 92: 3642-9 (1995); Beck J y et al., Leuk Lymphoma 41: 117-24 (2001); Cassady J et al., Chem Pharm Bull (Tokio) 52: 1-26 (2004); Sapra P y et al., Clin Cancer Res 11: 5257-64 (2005); Okeley N y et al., Clin Cancer Res 16: 888-97 (2010); Oroudjev E y et al., Mol Cancer Ther 9: 2700-13 (2010); Ellestad G, Chirality 23: 660-71 (2011); Kantarjian H y et al., Lancet Oncol 13: 403-11 (2012); Moldenhauer G y et al., J Natl Cancer Inst 104: 622-34 (2012); Meulendijks D et al., Invest New Drugs 34: 119-28 (2016)).

## 20 E. Relaciones estructura-función de las moléculas de reconocimiento celular de la invención

[0420] Para ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, existen relaciones específicas de estructura-función que se han observado, tales como, por ejemplo, efectos de orientación relativa del componente sobre la potencia citotóxica; efectos de sensibilidad de escisión por furina en la tolerabilidad in vivo a ciertas dosis; efectos de sensibilidad de escisión por furina sobre la estabilidad in vitro; efectos de sensibilidad de escisión por furina en la vida media in vivo; y efectos de sensibilidad de escisión por furina sobre la toxicidad no específica in vivo en organismos multicelulares.

[0421] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, el orden específico u orientación de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga y la región de unión se fija de modo que la región de unión se localice dentro de las moléculas de orientación celular más próximas a el extremo carboxi terminal de la región del polipéptido efector de toxina Shiga que el extremo amino de la región del polipéptido efector de toxina Shiga. En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la disposición de la región del polipéptido efector de toxina Shiga dentro de la molécula de reconocimiento celular está limitada a estar en y/o proximal al extremo amino terminal de un componente polipeptídico de la célula molécula dirigida (ver Figura 1). Por ejemplo, ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprenden 1) una región de unión orientada dentro de la molécula de reconocimiento celular en una posición carboxi-terminal a la región del polipéptido efector de la toxina Shiga, 2) una región de unión asociada con el Región del polipéptido efector de la toxina Shiga en una posición distal del extremo amino de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga (por ejemplo, distancias de 50, 100, 200 o 250 residuos de aminoácidos o más), 3) una región de unión que no cubre estéricamente el amino -terminus de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga, y/o 4) una región de unión que no impide estéricamente una estructura (s) cerca del extremo amino de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga (véase, por ejemplo, la Figura 1; WO 2015138452). En ciertas realizaciones adicionales, las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son capaces de exhibir una potencia citotóxica más óptima, tal como, por ejemplo, exhibir un valor de CD<sub>50</sub> que es 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces o más que una molécula de referencia de reconocimiento celular relacionada que comprende la misma región (s) de polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga y la (s) región (es) de unión, la región es 1) extremo amino terminal a la región del polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga, 2) asociada con la región del polipéptido efector de la toxina Shiga en una posición proximal al extremo amino de la región del polipéptido efector de la toxina Shiga (por ejemplo, distancias de menos de 50, 40, 30, 20 o 10 residuos de aminoácidos o menos), 3) que no cubre estéricamente el extremo amino terminal de la región del polipéptido efector de toxina Shiga, y/o 4) que no obstaculiza estéricamente una estructura (s) cerca del aminoácido terminal de la región del polipéptido efector de toxina Shiga (véase, por ejemplo, la Figura 1; WO 2015/138452).

[0422] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga de la presente invención comprende una región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1 de la toxina Shiga (tal como un sitio de escisión por furina alterado situado en el extremo carboxi terminal de una región de fragmento de toxina Shiga A1) (véase, por ejemplo, la Figura 1; WO 2015/191764). En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga es más resistente a la escisión por furina en comparación con una molécula de referencia relacionada, tal como, por ejemplo, una molécula que comprende un fragmento de tipo salvaje, subunidad de toxina A de Shiga A o fragmento de toxina de Shiga A1 (véase, por ejemplo, WO 2015/191764). En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención exhibe una reducción en la escisión por furina reproducible que se observa que es 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97 %, 98%, 99% o menos

(incluido el 100% sin escisión) que la escisión con furina de una molécula de referencia observada en el mismo ensayo en las mismas condiciones. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de la toxina Shiga es más resistente a la escisión a una proteasa distinta de la furina en comparación con una molécula de referencia relacionada, tal como, por ejemplo, una molécula que comprende un fragmento de la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje o de la toxina Shiga A1.

[0423] Ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención exhiben potencias citotóxicas dentro de 100 veces, 20 veces, 10 veces, 5 veces o menos que una molécula de referencia que comprende una región de polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje a pesar de la falta de cualquier característica estructural compensatoria para el motivo de escisión por furina alterado en el polipéptido efector de toxina Shiga. Para las moléculas de reconocimiento celular que comprenden regiones derivadas de la subunidad A de la toxina Shiga que no mantienen el evento de escisión por furina, es decir, las moléculas que comprenden componentes derivados de la subunidad A de la toxina Shiga que no son escindidas por la furina dentro de las células diana, una alternativa para preservar la citotoxicidad máxima es la compensación. La compensación por la falta de escisión por furina de una región de la subunidad A de la toxina Shiga en la molécula citotóxica podría lograrse presentando la región de la subunidad A de la toxina Shiga en una forma "preprocesada". Por ejemplo, una molécula de reconocimiento celular que comprende una región de la subunidad A de la toxina Shiga puede construirse de manera que el término carboxi del polipéptido derivado de la subunidad A de la toxina Shiga sea 1) proximal a un extremo carboxi de la molécula y 2) coincida o se parezca un fragmento nativo de la toxina Shiga A1 después de la escisión por furina (ver WO 2015/191764). Dicha compensación no se requiere en ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, sino que se evita intencionalmente para proporcionar una o más funciones, tales como, por ejemplo, una tolerabilidad in vivo mejorada a ciertas dosis; aumento de la estabilidad in vitro; aumento de la vida media in vivo; y/o reducción in vivo, toxicidad no específica en organismos multicelulares. Para ciertas realizaciones, estas funciones beneficiosas están presentes sin ninguna reducción significativa en la potencia citotóxica de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención en comparación con una molécula de referencia que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje.

[0424] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende un polipéptido efector de subunidad A de toxina Shiga que comprende una región derivada de fragmento de toxina Shiga A1 que comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxilo del fragmento de toxina Shiga A1 región derivada (tal como un sitio de escisión por furina alterado situado en el extremo carboxi terminal de una región de fragmento de toxina Shiga A1) (ver, por ejemplo, Figura 1; WO 2015/191764) pero no comprende ningún sitio de escisión de proteasa compensatoria proximal al carboxi terminal de la región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 y/u orientado entre el polipéptido efector de toxina Shiga y un resto de molécula relativamente grande (por ejemplo, una región de unión de un tamaño mayor que 4.5 kDa, 6 kDa, 9 kDa, 12 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 41 kDa o 50 kDa). En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende un polipéptido efector de toxina Shiga que es más resistente a la escisión por furina en comparación con una molécula de referencia relacionada, tal como, por ejemplo, una molécula que comprende una toxina Shiga de tipo salvaje. Una subunidad o fragmento de toxina Shiga A1 (véase, por ejemplo, WO 2015/191764). En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención exhibe una reducción en la escisión por furina del 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 98 %, 99% o 100% menos que la escisión con furina de una molécula de referencia observada en el mismo ensayo en las mismas condiciones, mientras que la molécula de reconocimiento celular exhibe una potencia citotóxica dentro de 100 veces, 20 veces, 10 veces, 5 veces, o menos que una molécula de referencia que comprende una región de polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención muestra una mejora en la tolerabilidad in vivo en comparación con una molécula de referencia relacionada que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga que tiene un motivo de escisión por furina de tipo salvaje y/o escisión por furina de tipo salvaje sitio en el extremo carboxi terminal de su región de fragmento de toxina Shiga A1 (véase, por ejemplo, WO 2015/191764). Por ejemplo, un aumento en la tolerabilidad in vivo puede determinarse comparando mediciones de mortalidad, signos de morbilidad y/o ciertos signos clínicos en grupos de animales de laboratorio a los que se administraron diferentes moléculas a las mismas dosis (ver, por ejemplo, Ejemplos, infra; WO 2015/191764).

[0425] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende un polipéptido efector de subunidad A de toxina Shiga que comprende una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 que comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxilo del fragmento de toxina Shiga A1 región derivada (tal como un sitio de escisión por furina alterado situado en el extremo carboxi de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1) (véase, por ejemplo, la Figura 1; WO 2015/191764). Para ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención que comprende un componente citotóxico, la molécula de reconocimiento celular exhibe una toxicidad no específica reducida en comparación con variantes más sensibles a la escisión de proteasas, que tienen una mayor propensión a romperse y, por lo tanto, libera el componente citotóxico de la región de unión, especialmente cuando se administra a materiales vivos, tales como, por ejemplo, una población de células, un tejido y/o un organismo. Además, ciertas moléculas de reconocimiento celular resistentes a la escisión por proteasa de la presente invención pueden exhibir semividas aumentadas, in vivo, después de la administración a materiales vivos (por ejemplo, ciertos cordados) en



comparación con variantes más sensibles a la escisión por proteasa basadas en la proteasa -resistencia a la ruptura conferida a la molécula de reconocimiento celular por el motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento de toxina Shiga A1.

### III. Enlaces que conectan componentes de la invención y/o sus subcomponentes

5 [0426] Las regiones de unión dirigidas a células individuales, los polipéptidos efectores de toxina Shiga y/o los componentes de las moléculas de orientación a células de la presente invención pueden unirse adecuadamente entre sí a través de uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica y/o descritos aquí. Los subcomponentes de polipéptidos individuales de las regiones de unión, por ejemplo, las regiones variables de la cadena pesada ( $V_H$ ), las regiones variables de la cadena ligera ( $V_L$ ), las regiones CDR y/o ABR, pueden estar adecuadamente unidas entre sí a través de uno o más enlazadores bien conocidos en el arte y/o descrito aquí. Los componentes proteínicos de la invención, por ejemplo, las regiones de unión de cadenas múltiples, pueden unirse adecuadamente entre sí u otros componentes de polipéptidos de la invención a través de uno o más enlazadores bien conocidos en la técnica. Los componentes peptídicos de la invención, por ejemplo, motivos de señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico de la familia KDEL, pueden unirse adecuadamente a otro componente de la invención a través de uno o más enlazadores, tales como un enlazador proteínico, que son bien conocidos en la técnica.

20 [0427] Los enlazadores adecuados son generalmente aquellos que permiten que cada componente polipeptídico de la presente invención se pliegue con una estructura tridimensional muy similar a los componentes del polipéptido producidos individualmente sin ningún enlazador u otro componente. Los enlazadores adecuados incluyen aminoácidos individuales, péptidos, polipéptidos y enlazadores que carecen de cualquiera de los mencionados anteriormente, tales como diversas cadenas de carbono no proteico, ya sean ramificadas o cíclicas.

25 [0428] Los enlazadores adecuados pueden ser proteicos y comprender uno o más aminoácidos, péptidos y/o polipéptidos. Los enlazadores proteínicos son adecuados tanto para proteínas de fusión recombinantes como para conjugados unidos químicamente. Un enlazador proteínico 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 cuales se está seleccionando el enlazador. En ciertas realizaciones, el enlazador es proteico y está unido cerca del término de un componente proteico de la presente invención, típicamente dentro de aproximadamente 20 aminoácidos del término.

35 [0429] Los enlazadores adecuados pueden ser no proteicos, tales como, por ejemplo, enlazadores químicos. Se pueden usar varios enlazadores no proteicos conocidos en la técnica para unir regiones de unión dirigidas a células a los componentes del polipéptido efector de toxina Shiga de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, tales como los enlazadores utilizados comúnmente para conjugar polipéptidos de inmunoglobulina con polipéptidos heterólogos. Por ejemplo, las regiones polipeptídicas pueden unirse usando las cadenas laterales funcionales de sus restos de aminoácidos y restos de carbohidratos tales como, por ejemplo, un grupo carboxilo, amina, sulfhidrilo, ácido carboxílico, carbonilo, hidroxilo y/o anillo cíclico. Por ejemplo, los enlaces disulfuro y los enlaces tioéter pueden usarse para unir dos o más polipéptidos. Además, los residuos de aminoácidos no naturales pueden usarse con otras cadenas laterales funcionales, como los grupos cetonas. Los ejemplos de enlazadores químicos no proteicos incluyen, entre otros, N-succinimidil (4-yodoacetil) -aminobenzoato, S- (N-succinimidil) tioacetato (SATA), N-succinimidil-oxicarbonil-cu-metil-a- (2 -piridilditio) tolueno (SMPT), N-succinimidil 4- (2-piridilditio) -pentanoato (SPP), succinimidil 4- (N-maleimidometil) ciclohexano carboxilato (SMCC o MCC), sulfosuccinimidilo (4-yodoacetil) -aminobenzoato, 4-aminobenzoato -succinimidil-oxicarbonil-a- (2-piridilditio) tolueno, sulfosuccinimidil-6- ( $\alpha$ -metil- $\alpha$ - (piridilditio) -toluamido) hexanoato, N-succinimidil-3 - (- 2-piridilditio) -propionato (SP), hexanoato de succinimidilo 6 (3 (- (- 2-piridilditio) -propionamido), sulfosuccinimidilo 6 (3 (- (- 2-piridilditio) -propionamido) hexanoato, maleimidocaproilo (MC), maleimidocaproil-valina-citrulino-p-aminobencarbonilo-p-aminobencarbonato MC-vc-PAB), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-maleimidobenzoico (MBS), derivados de alfa-alquilo, sulfoNHS-ATMBA (sulfosuccinimidil N- [3- (acetiltio) -3-metilbutiril-beta-alanina]), sulfodiclorofeno ol, 2-iminotiolano, 3- (2-piridilditio) -propionilhidrazida, reactivo de Ellman, ácido diclorotriazínico y S- (2-tiopiridil) -L-cisteína.

55 [0430] Los enlazadores adecuados, ya sean proteicos o no proteicos, pueden incluir, por ejemplo, enlazadores protectores sensibles al potencial redox ambiental, sensible al pH, sensible al ácido, fotoclavable y/o sensible al calor.

60 [0431] Los enlazadores proteínicos se pueden elegir para su incorporación en moléculas recombinantes dirigidas a células de fusión de la presente invención. Para las proteínas de fusión recombinante dirigidas a células de la invención, los enlazadores comprenden típicamente de aproximadamente 2 a 50 residuos de aminoácidos, preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 residuos de aminoácidos. Comúnmente, los enlazadores proteínicos comprenden una mayoría de residuos de aminoácidos con residuos polares, no cargados y/o cargados, tales como, por ejemplo, treonina, prolina, glutamina, glicina y alanina. Ejemplos no limitantes de enlazadores proteicos incluyen alanina-serina-glicina-glicina-prolina-glutamato (ASGGPE) (SEQ ID NO: 538), valina-metionina (VM), alanina-

metionina (AM), AM (G<sub>2 a 4</sub> S)<sub>x</sub> AM (SEQ ID NO: 539) donde G es glicina, S es serina y x es un número entero de 1 a 10.

[0432] Los enlazadores proteínicos se pueden seleccionar en base a las propiedades deseadas. Los trabajadores expertos pueden elegir los enlazadores de proteínas con características específicas en mente, tales como optimizar uno o más de los pliegues, la estabilidad, la expresión, la solubilidad, las propiedades farmacocinéticas, las propiedades farmacodinámicas y/o la actividad de los dominios fusionados de la molécula de fusión. El contexto de una construcción de fusión en comparación con la actividad del mismo dominio por sí mismo. Por ejemplo, los enlazadores proteínicos pueden seleccionarse en base a la flexibilidad, rigidez y/o capacidad de escisión. El trabajador calificado puede utilizar bases de datos y herramientas de software de diseño de vinculadores al elegir vinculadores. En ciertas realizaciones de la presente invención, se pueden elegir enlazadores para optimizar la expresión. En ciertas realizaciones, se pueden elegir enlazadores para promover interacciones intermoleculares entre polipéptidos o proteínas idénticos para formar homomultímeros o diferentes polipéptidos o proteínas para formar heteromultímeros. Por ejemplo, se pueden seleccionar enlazadores proteicos que permitan las interacciones no covalentes deseadas entre los componentes de polipéptidos de las moléculas que se dirigen a las células de la invención, tales como, por ejemplo, interacciones relacionadas con los dímeros de formación y otros multímeros de orden superior.

[0433] Los enlazadores proteínicos flexibles son a menudo mayores de 12 residuos de aminoácidos de largo y ricos en residuos de aminoácidos pequeños, no polares, residuos de aminoácidos polares y/o residuos de aminoácidos hidrofílicos, tales como, por ejemplo, glicinas, serinas y treoninas. Se pueden elegir enlazadores proteínicos flexibles para aumentar la separación espacial entre componentes y/o para permitir interacciones intramoleculares entre componentes. Por ejemplo, los trabajadores expertos conocen varios enlazadores "GS" y están compuestos de múltiples glicinas y/o una o más serinas, a veces en unidades repetitivas, tales como, por ejemplo, (G<sub>x</sub>S)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 540), (S<sub>x</sub>G)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 541), (GGGG)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 542) y (G)<sub>n</sub> (SEQ ID NO: 543), en el que x es de 1 a 6 y n es de 1 a 30. Los ejemplos no limitantes de enlazadores proteínicos flexibles incluyen GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO: 544), EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO: 545), GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO: 546), GSTSGSGKSSEGSGSTKG (SEQ ID NO: 547) GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 548), SRSSG (SEQ ID NO: 549) y SGSSC (SEQ ID NO: 550).

[0434] Los enlazadores proteínicos rígidos son a menudo estructuras alfa-helicoidales rígidas y ricas en residuos de prolina y/o una o más prolina situadas estratégicamente. Se pueden elegir enlazadores rígidos para evitar interacciones intramoleculares entre componentes unidos.

[0435] Se pueden elegir enlazadores adecuados para permitir la separación in vivo de componentes, tales como, por ejemplo, debido a la escisión y/o inestabilidad específica del entorno. Los enlazadores proteínicos escindibles in vivo son capaces de desvincularse mediante procesamiento proteolítico y/o entornos reductores a menudo en un sitio específico dentro de un organismo o dentro de cierto tipo de célula. Los enlazadores proteínicos escindibles in vivo a menudo comprenden motivos sensibles a proteasas y/o enlaces disulfuro formados por uno o más pares de cisteína. Los enlazadores de proteínas escindibles in vivo pueden estar diseñados para ser sensibles a las proteasas que existen solo en ciertas ubicaciones en un organismo, compartimentos dentro de una célula, y/o se vuelven activas solo bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas (tales como, por ejemplo, involucrando proteasas anormalmente niveles altos, proteasas sobreexpresadas en ciertos sitios de enfermedades y proteasas expresadas específicamente por un microorganismo patógeno). Por ejemplo, hay enlazadores proteínicos conocidos en la técnica que se cortan por proteasas presentes solo intracelularmente, proteasas presentes solo dentro de tipos de células específicas y proteasas presentes solo en condiciones patológicas como cáncer o inflamación, tales como, por ejemplo, motivo RxxR y AMGRSGGGCAGNRVGSLLSCGGLNLQAM (SEQ ID NO: 551).

[0436] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, se puede usar un enlazador que comprende uno o más sitios sensibles a proteasas para proporcionar la escisión por una proteasa presente dentro de una célula diana. En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la invención, se puede usar un enlazador que no es escindible para reducir la toxicidad no deseada después de la administración a un organismo vertebrado.

[0437] Los enlazadores adecuados pueden incluir, por ejemplo, enlazadores sensibles a proteasa, sensible a potencial redox ambiental, sensibles al pH, escindibles a ácido, fotoescindibles y/o sensibles al calor, ya sean proteicos o no proteicos (véase, por ejemplo, Doronina S et al., *Bioconjug Chem* 17: 114-24 (2003); Saito G et al., *Adv Drug Deliv Rev* 55: 199-215 (2003); Jeffrey S et al., *J Med Chem* 48: 1344-58 (2005); Sanderson R et al., *Clin Cancer Res* 11: 843-52 (2005); Erickson H et al., *Cancer Res* 66: 4426-33 (2006); Chen X et al., *Adv Drug Deliv Rev* 65: 1357-69 (2013)). Los enlazadores escindibles adecuados pueden incluir enlazadores que comprenden grupos escindibles que son conocidos en la técnica.

[0438] Los enlazadores adecuados pueden incluir enlazadores sensibles al pH. Por ejemplo, ciertos enlazadores adecuados pueden elegirse por su inestabilidad en entornos de pH más bajo para proporcionar la disociación dentro de un compartimento subcelular de una célula diana (véase, por ejemplo, Van Der Velden V y et al., *Blood* 97: 3197-

204 (2001); Ulbrich K, Subr V, Adv Drug Deliv Rev 56: 1023-50 (2004)). Por ejemplo, los enlazadores que comprenden uno o más grupos tritilo, grupos tritilo derivatizados, grupos bismaleimidetoxipropano, grupos dihidrazida de ácido adípico y/o grupos transferrina lábiles a ácidos, pueden proporcionar la liberación de componentes de las moléculas de reconocimiento celular de la invención, por ejemplo un componente polipeptídico, en entornos con rangos de pH específicos. En ciertos enlazadores pueden elegirse los que se escinden en rangos de pH correspondientes a las diferencias de pH fisiológico entre los tejidos, tales como, por ejemplo, el pH del tejido tumoral es menor que en los tejidos sanos.

[0439] Los enlazadores fotoclavables son enlazadores que se cortan tras la exposición a la radiación electromagnética de ciertos rangos de longitud de onda, como la luz en el rango visible. Los enlazadores fotoclavables se pueden usar para liberar un componente de una molécula de reconocimiento celular de la invención, por ejemplo, un componente polipeptídico, tras la exposición a la luz de ciertas longitudes de onda. Los ejemplos no limitantes de enlazadores fotoclavables incluyen un grupo nitrobenzilo como un grupo protector fotoclavable para reticuladores de cisteína, cloruro de nitrobenzilocarbonilo, copolímero de hidroxipropilmetacrilamida, copolímero de glicina, copolímero de fluoresceína y copolímero de metilrodamina. Los enlazadores fotoclavables pueden tener usos particulares en la unión de componentes para formar moléculas que se dirigen a las células de la invención diseñadas para tratar enfermedades, trastornos y afecciones que pueden exponerse a la luz usando fibra óptica.

[0440] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, una región de unión de reconocimiento celular está unida a un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención usando cualquier número de medios conocidos por el experto en la materia, incluidos enlaces covalentes como enlaces no covalentes.

[0441] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la molécula 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 ( $V_L$ ). Existen numerosos enlazadores conocidos en la técnica adecuados para este propósito, tales como, por ejemplo, el péptido (Gly4Ser)<sub>3</sub> de 15 residuos (SEQ ID NO: 552). Los enlazadores scFv adecuados que pueden usarse para formar estructuras multivalentes no covalentes incluyen GGS (SEQ ID NO: 553), GGGS (SEQ ID NO: 554), GGGGS (SEQ ID NO: 555), GGGGSGGG (SEQ ID NO: 556), GGSGGGG (SEQ ID NO: 557), GSTSGGGSGGGSGGGSS (SEQ ID NO: 558) y GSTSGSGKPGSSEGSTKG (SEQ ID NO: 559).

[0442] Los procedimientos adecuados para la unión de los componentes de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden ser mediante cualquier procedimiento actualmente conocido en la técnica para lograrlo, siempre que la unión no impida sustancialmente la capacidad de unión de la región de unión de reconocimiento celular, la internalización celular del componente del polipéptido efector de la toxina Shiga, y/o cuando sea apropiado la(s) función(es) efectora(s) de la toxina Shiga deseada según se mide mediante un ensayo apropiado, incluidos los ensayos descritos en este documento.

[0443] Para los fines de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, el orden u orientación específica no está fijado para los componentes: el (los) polipéptido(s) efector(es) de la toxina Shiga, la(s) región(es) de unión y cualquier enlazador(es) opcional(es), en relación entre sí o con la molécula de reconocimiento celular completa (véase, por ejemplo, la Figura 1), a menos que se indique específicamente. Los componentes de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención se pueden disponer en cualquier orden siempre que no se eliminen las actividades deseadas de la región de unión y el polipéptido efector de la toxina Shiga.

#### IV. Ejemplos de variaciones estructurales de los polipéptidos efectores de toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la invención

[0444] En ciertas realizaciones, un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención puede comprender o consistir esencialmente en una subunidad A troncada de toxina Shiga. Los truncamientos de las subunidades A de la toxina Shiga pueden provocar la eliminación de un epítipo(s) completo(s) y/o región(ess) del epítipo, epítipos de células B, epítipos de células T CD4+ y/o sitios de escisión por furina sin afectar las funciones efectoras de toxina Shiga, tales como, por ejemplo, actividad catalítica y citotoxicidad. El fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que se muestra que exhibe actividad enzimática completa fue un polipéptido compuesto por los residuos 1-239 de SlT1A (LaPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). El fragmento más pequeño de la subunidad A de la toxina Shiga que se muestra que exhibe actividad enzimática significativa fue un polipéptido compuesto por los residuos 75-247 de StxA (Al-Jaufy A y et al., Infect Immun 62: 956-60 (1994)).

[0445] Aunque los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención pueden ser comúnmente más pequeños que la subunidad A de la toxina Shiga de longitud completa, se prefiere que la región del polipéptido efector de la toxina Shiga de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención mantenga la región polipeptídica desde la posición de aminoácidos 77 a 239 (SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2)) o el equivalente en otras Subunidades A de miembros de la familia de toxinas Shiga (por ejemplo, 77 a 238 de (SEQ ID

NO: 3)). Por ejemplo, en ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención derivados de SLT-1A pueden comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, o aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, en donde en relación con una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, al menos un residuo de aminoácido está mutado o tiene se ha eliminado en un epítipo endógeno y/o región de epítipo, y/o en el que hay una región de motivo de escisión por furina alterada en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1. De manera similar, las regiones del polipéptido efector de la toxina Shiga derivadas de StxA pueden comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 2, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 2, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 2, o amino ácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 2, en donde en relación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje, al menos un residuo de aminoácido está mutado o se ha eliminado en un epítipo endógeno y/o región de epítipo, y/o en donde hay una región de motivo de escisión por furina alterada en el extremo carboxi de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1. Además, las regiones del polipéptido efector de la toxina Shiga derivadas de SLT-2 pueden comprender o consistir esencialmente en los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 3, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 3, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 3, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 3, en donde, en relación con una subunidad de la toxina Shiga de tipo salvaje, al menos un residuo de aminoácido está mutado o ha sido eliminado en un epítipo endógeno y/o región de epítipo, y/o en donde hay una región de motivo de escisión por furina alterada en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1.

[0446] La invención proporciona además variantes de polipéptidos efectores de toxina Shiga y moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, en donde el polipéptido efector de toxina Shiga difiere de una subunidad A de toxina Shiga natural en solo o hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o más residuos de aminoácidos (pero no más de lo que retiene al menos 85%, 90%, 95%, 99 % o más identidad de secuencia de aminoácidos). Por lo tanto, una molécula de la presente invención derivada de una Subunidad A de un miembro de la familia de toxinas Shiga puede comprender adiciones, deleciones, truncamientos u otras alteraciones de la secuencia original siempre que sea al menos 85%, 90%, 95%, La identidad de secuencia de aminoácidos del 99% o más se mantiene con una subunidad A de toxina Shiga de origen natural y en donde, en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, al menos un residuo de aminoácido está mutado o se ha eliminado en un epítipo y/o epítipo endógeno región, y/o en donde hay una región de motivo de escisión por furina alterada en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1.

[0447] Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de una molécula de la presente invención comprende o consiste esencialmente en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% o 99.7% de identidad de secuencia general a una subunidad de la toxina Shiga de origen natural, como SLT-1A (SEQ ID NO: 1), StxA (SEQ ID NO: 2), y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3) en donde, en relación con una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, al menos un residuo de aminoácido está mutado o ha sido eliminado en un epítipo endógeno y/o región del epítipo, y/o en la que hay una región de motivo de escisión por furina alterada en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1.

[0448] Opcionalmente, una versión completa o truncada de la subunidad A de la toxina Shiga puede comprender la región del polipéptido efector de la toxina Shiga de una molécula de la presente invención, en donde el polipéptido derivado de la toxina Shiga comprende una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones, deleciones, inserciones o inversiones) en comparación con una toxina Shiga natural. Se prefiere en ciertas realizaciones de la invención que los polipéptidos efectores de la toxina Shiga tengan una identidad de secuencia suficiente con una subunidad de la toxina Shiga de origen natural para retener la citotoxicidad después de la entrada en una célula, ya sea por procedimientos bien conocidos de transformación, transfección, infección de la célula huésped. o inducción, o por internalización mediada por una región de unión de reconocimiento celular unida con el polipéptido efector de la toxina Shiga. Los residuos más críticos para la actividad enzimática y/o la citotoxicidad en las subunidades de la toxina Shiga A se han mapeado en las siguientes posiciones de residuos: asparagina-75, tirosina-77, glutamato-167, arginina-170 y arginina-176 entre otros (Di R y et al., Toxicon 57: 525-39 (2011)). En cualquiera de las realizaciones de la invención, los polipéptidos efectores de toxina Shiga pueden preferiblemente pero no necesariamente mantener uno o más aminoácidos conservados en posiciones, tales como los encontrados 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 molécula citotóxica de la invención para causar la muerte celular, por ejemplo, su citotoxicidad, se puede medir usando uno o más de varios ensayos bien conocidos en la técnica.

#### A. Ejemplos de polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados

[0449] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención puede consistir esencialmente en una subunidad truncada de toxina Shiga A que tiene dos o más mutaciones. Los truncamientos de las subunidades de la toxina Shiga A pueden provocar la eliminación de un epítipo (s) completo y/o región (s) del epítipo, epítopos de células B, epítopos de células T CD4 + y/o sitios de escisión por furina sin afectar el efector de toxina Shiga funciones, tales como, por ejemplo, actividad catalítica y citotoxicidad. Truncar el

extremo carboxi terminal de SLT-1A, StxA o SLT-2A a los aminoácidos 1-251 elimina dos regiones de epítipo de células B predichas, dos epítipos de células T positivas CD4 positivas (CD4 +) y una célula B discontinua predicha epítipo Truncar el extremo amino de SLT-1A, StxA o SLT-2A a 75-293 elimina al menos tres regiones de epítipos de células B predichas y tres epítipos de células T CD4 + predichas. Truncar los terminales amino y carboxi de SLT-1A, StxA o SLT-2A a 75-251 elimina al menos cinco regiones de epítipos de células B predichas, cuatro supuestos epítipos de células T CD4 + y un epítipo de células B discontinuo previsto.

[0450] En ciertas realizaciones, un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención puede comprender o consistir esencialmente en una Subunidad A de toxina Shiga de longitud completa o troncada con al menos una mutación (en relación con una toxina Shiga de tipo salvaje polipéptido), por ejemplo, deleción, inserción, inversión o sustitución, en una región del epítipo de células T endógena, de células B y/o de células T CD4 +. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende una alteración que comprende una mutación (en relación con un polipéptido de toxina Shiga de tipo salvaje) que incluye una deleción de al menos un residuo de aminoácido dentro de la célula B endógena y/o región del epítipo de células T CD4 +. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende una alteración que comprende una inserción de al menos un residuo de aminoácido dentro de la región del epítipo endógeno, de células B y/o de células T CD4 +. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende una alteración que comprende una inversión de residuos de aminoácidos, en donde al menos un residuo de aminoácido invertido está dentro de la región del epítipo endógeno, de células B y/o de células T CD4 +. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención comprende una alteración que comprende una mutación (en relación con un polipéptido de la toxina Shiga de tipo salvaje), tal como, por ejemplo, una sustitución de aminoácidos, una sustitución de aminoácidos por una no aminoácido estándar, y/o un residuo de aminoácido con una cadena lateral modificada químicamente. Ejemplos no limitantes de subregiones efectoras de toxina Shiga desinmunizadas adecuadas para su uso en la presente invención se describen en los documentos WO 2015/113005, WO 2015/113007 y WO 2015/191764. En los ejemplos se proporcionan numerosos ejemplos no limitativos de polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención que comprenden sustituciones de aminoácidos.

[0451] En otras realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de la presente invención comprende una subunidad A de toxina Shiga troncada que es más corta que una subunidad A de toxina Shiga de longitud completa en la que al menos un residuo de aminoácido se altera en una región de epítipo de células B y/o de células T CD4 + situada de forma nativa proporcionada en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o la Tabla B).

[0452] Para crear un polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado, en principio modificar cualquier residuo de aminoácido en una región de epítipo proporcionada por varios medios puede dar como resultado una alteración de un epítipo, tal como, por ejemplo, una modificación que representa una deleción, inserción, inversión, reordenamiento, sustitución y modificación química de una cadena lateral en relación con un polipéptido de toxina Shiga de tipo salvaje. Sin embargo, la modificación de ciertos residuos de aminoácidos y el uso de ciertas modificaciones de aminoácidos tienen más probabilidades de reducir con éxito la antigenicidad y/o la inmunogenicidad mientras se mantiene un cierto nivel de una función o funciones efectoras de la toxina Shiga. Por ejemplo, se prefieren los truncamientos terminales y las sustituciones internas de aminoácidos porque estos tipos de modificaciones mantienen la separación global de los residuos de aminoácidos en un polipéptido efector de toxina Shiga y, por lo tanto, es más probable que mantengan la estructura y función del polipéptido efector de toxina Shiga.

[0453] Entre ciertas realizaciones de la presente invención, el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado 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) en donde al menos un residuo de aminoácido se interrumpe en una región de epítipo situada de forma nativa proporcionada en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12). Entre ciertas otras realizaciones se encuentran los polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados que comprenden o consisten 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) en la que al menos un residuo de aminoácido se rompe en una región epítipo situada de forma nativa proporcionada en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12). Otras realizaciones son polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados que comprenden o consisten 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) en donde al menos un residuo de aminoácido se rompe en una región de epítipo situada de forma nativa proporcionada en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12). Otras realizaciones son polipéptidos efectores de toxina Shiga que comprenden 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 donde al menos un residuo de aminoácido se rompe en una región de epítipo situada de forma nativa proporcionada en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12).

[0454] Existen numerosas y diversas sustituciones internas de aminoácidos que pueden usarse para crear polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados de la invención. De los posibles aminoácidos sustitutos para usar dentro de una región del epítipo, se predice que los siguientes residuos de aminoácidos sustitutos son los más propensos a reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad de un epítipo: G, D, E, S, T, R, K y H. Excepto para la

5 glicina, estos residuos de aminoácidos pueden clasificarse como residuos polares y/o cargados. De los posibles aminoácidos para sustituir, se predice que los siguientes aminoácidos A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H y K son los más probables para reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad mientras se proporciona la retención de un nivel significativo de una función o funciones efectoras de la toxina Shiga, dependiendo del aminoácido sustituido. En general, la sustitución debe cambiar un residuo de aminoácido polar y/o cargado a un residuo no polar y sin carga (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/113005). Además, puede ser beneficioso para la alteración del epítipo reducir el tamaño general y/o la longitud de la cadena lateral funcional del grupo R del residuo de aminoácido (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/113005). Sin embargo, a pesar de estas generalidades de sustituciones, es más probable que confieran la alteración del epítipo, porque el objetivo es preservar las funciones efectoras de la toxina Shiga significativas, el aminoácido sustituto podría ser más propenso a preservar las funciones efectoras de la toxina Shiga si se parece al aminoácido sustituido por, tal como, por ejemplo, un residuo no polar y/o no cargado de tamaño similar sustituido por un residuo polar y/o cargado.

15 [0455] En los ejemplos a continuación y en el documento WO 2015/113005, muchas mutaciones se han probado empíricamente para determinar el (los) efecto (s) sobre la función efectora de la toxina Shiga de varios polipéptidos efectores de la toxina Shiga y moléculas de reconocimiento celular. La Tabla B resume los resultados descritos en los Ejemplos y en el documento WO 2015/113005 donde una sustitución de aminoácidos, sola o en combinación con una o más sustituciones, no impidió la exhibición de un nivel potente de una función o funciones efectoras de la toxina Shiga. La Tabla B usa el esquema de numeración de la región del epítipo descrito en los Ejemplos a continuación (ver Ejemplo 1-Tabla 7, infra).

TABLA B. Sustituciones de aminoácidos en polipéptidos efectores de toxina Shiga

Región de epítipo alterada	posiciones de aminoácidos situados de forma nativa		
	Sustitución	Región de epítipo de células B	Epítipo de células T
1	K1A	1-15	
1	K1M	1-15	
1	T4I	1-15	4-33
1	D6R	1-15	4-33
1	S8I	1-15	4-33
1	T9V	1-15	4-33
1	T9I	1-15	4-33
1	K11A	1-15	4-33
1	K11H	1-15	4-33
1	T12K	1-15	4-33
2	S33I	27-37	4-33
2	S33C	27-37	4-33
3	S43N	39-48	34-78
3	G44L	39-48	34-78
3	T45V	39-48	34-78
3	T45I	39-48	34-78
3	S45V	39-48	34-78
3	S45I	39-48	34-78
3	G46P	39-48	34-78
3	D47G	39-48	34-78
3	D47M	39-48	34-78
3	N48V	39-48	34-78
3	N48F	39-48	34-78
-	L49A	residuo inmunogénico	34-78
-	F50T		34-78
-	A51V		34-78
4	D53A	53-66	34-78
4	D53G	53-66	34-78
4	D53N	53-66	34-78
4	V54L	53-66	34-78
4	V54I	53-66	34-78
4	R55A	53-66	34-78
4	R55V	53-66	34-78
4	R55L	53-66	34-78
4	G56P	53-66	34-78
4	I57M	53-66	34-78
4	I57F	53-66	34-78

ES 2 847 373 T3

4	D58A	53-66	34-78
4	D58V	53-66	34-78
4	D58F	53-66	34-78
4	P59A	53-66	34-78
4	P59F	53-66	34-78
4	E60I	53-66	34-78
4	E60T	53-66	34-78
4	E60R	53-66	34-78
4	E61A	53-66	34-78
4	E61V	53-66	34-78
4	E61L	53-66	34-78
4	G62A	53-66	34-78
-	R84A		77-103
-	V88A		77-103
5	D94A	94-115	77-103
5	S96I	94-115	77-103
5	T104N	94-115	
5	A105L	94-115	
5	T107P	94-115	
5	L108M	94-115	
5	S109V	94-115	
5	G110A	94-115	
5	D111T	94-115	
5	S112V	94-115	
6	D141A	141-153	128-168
6	G147A	141-153	128-168
-	V154A		128-168
7	R179A	179-190	160-183
7	T180G	179-190	160-183
7	T181I	179-190	160-183
7	D183A	179-190	160-183
7	D183G	179-190	160-183
7	D184A	179-190	
7	D184F	179-190	
7	L185V	179-190	
7	S186A	179-190	
7	S186F	179-190	
7	G187A	179-190	
7	G187T	179-190	
7	R188A	179-190	
7	R188L	179-190	
7	S189A	179-190	
-	D198A	residuo inmunogénico	
-	D205A	residuo inmunogénico	
-	C242S		236-258
8	R248A	243-257	236-258
8	R251A	243-257	236-258

[0456] En base a la evidencia empírica en los ejemplos de este documento y en el documento WO 2015/113005, se predice que ciertas posiciones de aminoácidos en las subunidades A de las toxinas Shiga tolerarán las alteraciones del epítipo mientras conservan funciones efectoras de la toxina Shiga significativas. Por ejemplo, las siguientes posiciones que se producen de forma nativa toleran las sustituciones de aminoácidos, ya sea solas o en combinación, a la vez que retienen una función o funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como la citotoxicidad -

5 1 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 44 de SEQ ID NO: 1 o

10 SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 46 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 50 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 51 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 54 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 56 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 57 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID

15 NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID

NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 84 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 88 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 104 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 105 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 107 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 108 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 111 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 154 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 185 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 198 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 241 de SEQ ID NO: 3; 242 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 248 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de SEQ ID NO: 3; 251 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

[0457] Los datos empíricos en los Ejemplos y en el documento WO 2015/113005 apuntan a otras sustituciones disruptivas del epítipo y combinaciones de sustituciones disruptivas del epítipo que pueden reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad de un polipéptido efector de la toxina Shiga mientras conserva la capacidad del efector de la toxina Shiga polipéptido para exhibir una función efectora de la toxina Shiga significativa tal como, por ejemplo, nuevas combinaciones de las truncaciones y posiciones que toleran sustituciones mencionadas anteriormente, así como nuevas sustituciones en posiciones idénticas o posiciones conservadas en subunidades de toxina Shiga relacionadas.

[0458] Es predecible que otras sustituciones de aminoácidos a residuos de aminoácidos de un grupo funcional conservador de una sustitución probada en la presente memoria pueden reducir la antigenicidad y/o inmunogenicidad mientras se preserva una función efectora de la toxina Shiga significativa. Por ejemplo, otras sustituciones conocidas por el trabajador calificado son similares a cualquiera de K1A, K1M, T4I, D6R, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, T12K, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, D47G, N48V, N48F, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, D53G, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P57 P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, R84A, V88A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D14A, D10 T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, R188L, S188A, D188L, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, o D264A, G264A, T286A y/o T286I pueden alterar un epítipo endógeno mientras mantienen al menos una función efectora de la toxina Shiga. En particular, sustituciones de aminoácidos a residuos de aminoácidos conservadores similares a K1A, K1M, T4I, S8I, T8V, T9I, S9I, K11A, K11H, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, S45I, T45V, T45I, G46P, D47M, N48V, N48F, L49A, A51V, D53A, D53N, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, E60I, E60T, E61A, E61V, E61L, G62A, V88A, D94A, S96I, T104N, T107P, L108M, S109V, T109V, G110A, D111T, S112V, D141A, G147A, V154A, R179A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185V, S186A, S186F, G187A, R188A, R188L, S189A, D198A, R204A, R205A, C242S, S247I, Y247A, R248A, R250A, R251A, D264A, G264A, T286A y T286I pueden tener los mismos efectos o similares. En ciertas realizaciones, un polipéptido efector de toxina Shiga de la invención puede comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras similares a las probadas empíricamente, tales como, por ejemplo, K1 a G, V, L, I, F y H; T4 a A, G, V, L, F, M y S; S8 a A, G, V, L, F y M; T9 a A, G, L, F, M y S; S9 a A, G, L, I, F y M; K11 a G, V, L, I, F y M; S33 a A, G, V, L, F y M; S43 a A, G, V, L, I, F y M; S45 a A, G, L, F y M; T45 a A, G, L, F y M; D47 a A, V, L, I, F, S y Q; N48 a A, G, L y M; L49 a G; Y49 a A; D53 a V, L, I, F, S y Q; R55 a G, I, F, M, Q, S, K y H; D58 a G, L, I, S y Q; P59 a G; E60 a A, G, V, L, F, S, Q, N, D y M; E61 a G, I, F, S, Q, N, D, M y R; R84 a G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; V88 a G; 188 a G; D94 a G, V, L, I, F, S y Q; S96 a A, G, V, L, F y M; T107 a A, G, V, L, I, F, M y S; S107 a A, G, V, L, I, F y M; S109 a A, G, I, L, F y M; T109 a A, G, I, L, F, M y S; S112 a A, G, L, I, F y M; D141 a V, L, I, F, S y Q; V154 a G; R179 a G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; T180 a A, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, F, M y S; D183 a V, L, I, F, S y Q; D184 a G, V, L, I, S y Q; S186 a G, V, I, L y M; R188 a G, V, I, F, M, Q, S, K y H; S189 a G, V, I, L, F y M; D197 a V, L, I, F, S y Q; D198 a A, V, L, I, F, S y Q; R204 a G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R205 a G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F y M; R248 a G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R250 a G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R251 a G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S y Q; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

[0459] De manera similar, las sustituciones de aminoácidos que eliminan la carga, la polaridad y/o reducen la longitud de la cadena lateral pueden interrumpir un epítipo mientras se mantiene al menos una función efectora de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones, un polipéptido efector de toxina Shiga de la invención puede comprender uno o más epítopos alterados por sustituciones de modo que se elimine la carga de la cadena lateral, se elimine la polaridad y/o se reduzca la longitud de la cadena lateral, por ejemplo, sustituyendo el amino apropiado ácido seleccionado del siguiente grupo A, G, V, L, I, P, C, M, F, S, D, N, Q, H o K para el residuo de aminoácido en la posición 1 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 6 de SEQ ID



NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 12 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 44 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 46 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 50 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 51 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 54 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 56 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 57 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 84 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 88 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 104 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 105 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 107 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 108 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 111 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 154 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 185 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 197 de la SEQ ID NO: 3; 198 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 241 de SEQ ID NO: 3; 242 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 248 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de SEQ ID NO: 3; 251 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención puede comprender una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; D6 a A, G, V, L, I, F, S y Q; S8 a A, G, V, I, L, F y M; T8 a A, G, V, I, L, F, M y S; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; T12 a A, G, V, I, L, F, M y S; S33 a A, G, V, L, I, F y M; S43 a A, G, V, L, I, F y M; G44 a A y L; S45 a A, G, V, L, I, F y M; T45 a A, G, V, L, I, F y M; G46 a A y P; D47 a A, G, V, L, I, F, S y Q; N48 a A, G, V, L y M; L49 a A o G; F50 a A, G, V, L, I y T; A51 a V; D53 a A, G, V, L, I, F, S y Q; V54 a A, G y L; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; G56 a A y P; 157 a A, G, M y F; L57 a A, G, M y F; D58 a A, G, V, L, I, F, S y Q; P59 a A, G y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; D94 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R84 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; V88 a A y G; 188 a A, G y V; D94; S96 a A, G, V, I, L, F y M; T104 a A, G, V, I, L, F, M y S; A105 a L; T107 a A, G, V, I, L, F, M y S; S107 a A, G, V, L, I, F y M; L108 a A, G y M; S109 a A, G, V, I, L, F y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; D111 a A, G, V, L, I, F, S y Q; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D141 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G147 a A; V154 a A y G; R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S y Q; L185 a A, G y V; S186 a A, G, V, I, L, F y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S189 a A, G, V, I, L, F y M; D197 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D198 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; C242 a A, G, V y S; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; C262 a A, G, V y S; D264 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

[0460] Además, cualquier sustitución de aminoácidos en una región del epítipo de un polipéptido efector de la toxina Shiga que interrumpe un epítipo mientras retiene la función efectora de la toxina Shiga es combinable con cualquier otra sustitución de aminoácidos en la misma región o en una región diferente del epítipo que interrumpe un epítipo mientras se conserva una función efectora de la toxina Shiga significativa para formar un polipéptido efecto efector de la toxina Shiga desimmunizado con múltiples regiones del epítipo alteradas mientras se conserva un nivel significativo de función efectora de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones, un polipéptido efector de toxina Shiga de la invención puede comprender una combinación de dos o más de las sustituciones mencionadas anteriormente y/o las combinaciones de sustituciones descritas en el documento WO 2015/113005.

[0461] En base a la evidencia empírica en los Ejemplos y en el documento WO 2015/113005, se predice que ciertas regiones de aminoácidos en las Subunidades A de las toxinas Shiga tolerarán las alteraciones del epítipo mientras aún conservan funciones efectoras de la toxina Shiga significativas. Por ejemplo, las regiones del epítipo situadas de forma nativa en 1-15, 39-48, 53-66, 55-66, 94-115, 180-190, 179-190 y 243-257 toleraron múltiples combinaciones de sustitución de aminoácidos simultáneamente sin comprometer Actividad enzimática de la toxina Shiga y citotoxicidad.

#### 60 B. Ejemplos de polipéptidos efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión por furina

[0462] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención puede comprender un motivo de escisión por furina alterado y/o un sitio de escisión por furina en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1. En ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de la toxina Shiga no comprende ninguna estructura compensatoria conocida que pueda proporcionar la escisión por furina

proximal al extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento de la toxina Shiga A1. En el documento WO 2015/191764 se describen ejemplos no limitativos de motivos de escisión por furina alterados y sitios de escisión por furina adecuados para su uso en la presente invención.

5 [0463] Ciertas alteraciones del motivo de escisión por furina se indican en el presente documento con referencia a las posiciones de aminoácidos específicas de las subunidades de la toxina A Shiga nativas proporcionadas en el Listado de secuencias, observando que las subunidades de la toxina A Shiga de origen natural incluyen formas precursoras que contienen secuencias señal de aproximadamente 22 aminoácidos en sus terminales amino que se eliminan para producir subunidades maduras de toxina Shiga A y son reconocibles para el trabajador  
10 calificado. Además, ciertas alteraciones del motivo de escisión por furina que comprenden mutaciones se indican en este documento por referencia a aminoácidos específicos (por ejemplo, R para un residuo de arginina) presentes de forma nativa en posiciones específicas dentro de las subunidades de la toxina A Shiga nativas (por ejemplo, R251 para el residuo de arginina en la posición 251 de la extremo amino terminal) seguido por el aminoácido con el que ese residuo ha sido sustituido en la mutación particular en discusión (por ejemplo, R251A representa la sustitución  
15 de aminoácidos de alanina por arginina en el residuo aminoácido 251 del extremo amino terminal).

[0464] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1, y tales realizaciones se denominan en el presente documento "resistentes a la escisión por furina "o" resistentes a la  
20 escisión de la proteasa, "polipéptidos efectores de la toxina Shiga para describir sus propiedades con respecto a las proteínas de fusión de fragmentos de la toxina Shiga A de tipo salvaje y/o subunidades A de tipo salvaje.

[0465] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión de la proteasa de la presente invención consiste esencialmente en una subunidad truncada de la toxina Shiga A que tiene dos o más  
25 mutaciones.

[0466] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa de la presente invención comprende el motivo de escisión por furina alterado que comprende la sustitución del residuo de aminoácido (en relación con un polipéptido de toxina Shiga de tipo salvaje) de uno o ambos los residuos de arginina  
30 en el motivo de consenso mínimo del sitio de escisión por furina con A, G o H. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión de proteasa de la presente invención comprende una alteración que comprende una sustitución de aminoácidos dentro de un región de motivo de escisión por furina, donde en la sustitución se produce en el aminoácido posicionado de forma nativa seleccionado del grupo que consiste en: 247 de SEQ ID NO: 3, 248 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, 250 de SEQ ID NO: 3, 251 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID  
35 NO: 2, o la posición equivalente en un polipéptido efector de toxina Shiga conservado y/o una secuencia de polipéptido efector de toxina Shiga no nativa. En ciertas realizaciones adicionales, la sustitución es a cualquier aminoácido no conservador y la sustitución se produce en la posición del residuo de aminoácido colocado de forma nativa. En ciertas realizaciones adicionales, la mutación comprende una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: R247A, R248A, R250A R251A, o la posición equivalente en un polipéptido efector de  
40 toxina Shiga conservado y/o una secuencia de polipéptido efector de toxina Shiga no nativa.

[0467] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa de la presente invención comprende el motivo de escisión por furina alterado que comprende la mutación que es una  
45 delección. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una mutación que es una delección de la región situada de forma nativa en 247-252 en StxA (SEQ ID NO: 2) y SLT-1A (SEQ ID NO: 3), o el región situada de forma nativa en 246-251 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3); una eliminación de la región nativamente posicionada en 244-246 en StxA (SEQ ID NO: 2) y SLT-1A (SEQ ID NO: 3), o la región nativamente posicionada en 243-245 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3); o una eliminación de la región situada de forma nativa en 253-259 en StxA (SEQ ID NO: 2) y SLT-1A (SEQ ID NO: 3), o la región posicionada de forma nativa en 252-258 en SLT-2A (SEQ ID  
50 NO : 3).

[0468] En ciertas realizaciones del polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por proteasa de la presente invención, el motivo de escisión por furina alterado comprende la mutación que es un truncamiento carboxi terminal en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje A, el truncamiento que da como  
55 resultado la eliminación de uno o más residuos de aminoácidos dentro del motivo de escisión por furina. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterada comprende el truncamiento carboxi terminal que elimina uno o más residuos de aminoácidos dentro del sitio de escisión mínimo Y/RxxR, tal como, por ejemplo, para polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A., truncamientos que terminan en la posición de residuo de aminoácido nativa 250, 249, 248, 247, 246, 245, 244, 243, 242, 241, 240 o menos; y para los polipéptidos  
60 efectores de toxina Shiga derivados de SLT-2A, truncamientos que terminan en la posición de residuo de aminoácido nativa 249, 248, 247, 246, 245, 244, 243, 242, 241 o menos. Ciertas realizaciones adicionales comprenden el motivo de escisión por furina alterado que comprende una combinación de cualquiera de las mutaciones mencionadas anteriormente, cuando sea posible.

[0469] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende la (s) mutación (es) que es un  
65

truncamiento parcial, carboxi-terminal del motivo de escisión por furina; sin embargo, ciertas moléculas de la presente invención no comprenden el motivo de escisión por furina alterado, que es un truncamiento completo, carboxi-terminal del motivo de escisión por furina completo de 20 aminoácidos. Por ejemplo, ciertos polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención comprenden el motivo de escisión por furina alterado que comprende un truncamiento parcial, carboxi-terminal de la región del fragmento de la toxina Shiga A1 hasta la posición nativa 240 en StxA (SEQ ID NO: 2) o SLT-1A (SEQ ID NO: 1) pero no un truncamiento carboxi-terminal en la posición 239 o menos. De manera similar, ciertos polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención comprenden el motivo de escisión por furina alterado que comprende un truncamiento parcial, carboxi-terminal de la región del fragmento de toxina Shiga A1 hasta la posición nativa 239 en SLT-2A (SEQ ID NO: 3) pero no es un truncamiento carboxilo terminal en la posición 238 o menos. En el truncamiento carboxi-terminal más grande del polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por furina de la presente invención, las mutaciones que comprenden el motivo de escisión por furina alterado, las posiciones P14 y P13 del motivo de escisión por furina todavía están presentes.

[0470] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una sustitución de residuo de aminoácido dentro del motivo de escisión por furina como un truncamiento carboxi terminal en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una sustitución de residuo de aminoácido dentro del sitio de escisión por furina mínimo R/YxxR como un truncamiento carboxi terminal en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, para los polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A, truncamientos que terminan en la posición de residuo de aminoácido nativo 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291 o superior y que comprende el residuo de aminoácido R248 y/o R251 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente cuando sea apropiado; y para los polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de SLT-2A, truncamientos que terminan en la posición de residuo de aminoácido nativa 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291 o superior y que comprende el residuo de aminoácido Y247 y/o R250 colocado de forma nativa sustituido con cualquier residuo de aminoácido no cargado positivamente cuando sea apropiado. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga truncado que comprende un motivo de escisión por furina alterado también comprende el motivo de escisión por furina, residuos de aminoácidos en las posiciones P9, P8 y/o P7 para mantener una citotoxicidad óptima.

[0471] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una mutación (es) que es una o más deleciones internas de residuos de aminoácidos, en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una mutación (es) que tiene una o más deleciones de residuos de aminoácidos dentro del sitio de escisión por furina mínimo R/YxxR. Por ejemplo, los polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A que comprenden deleciones internas de los residuos de aminoácidos colocados de forma nativa R248 y/o R251, que pueden combinarse con deleciones de residuos circundantes tales como, por ejemplo, 249, 250, 247, 252, etc .; y polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de SLT-2A que comprenden deleciones internas de los residuos de aminoácidos colocados de forma nativa Y247 y/o R250, que pueden combinarse con deleciones de residuos circundantes tales como, por ejemplo, 248, 249, 246, 251, etc. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterada comprende una mutación que es una deleción de cuatro residuos de aminoácidos consecutivos que elimina el sitio mínimo de escisión por furina R/YxxR, tal como, por ejemplo, polipéptidos efectores de toxina Shiga derivada de StxA y SLT-1A que carecen de R248-R251 y polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de SLT-2A que carecen de Y247-R250. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones que tienen una o más deleciones de residuos de aminoácidos en los residuos de aminoácidos que flanquean el motivo de escisión por furina central, tales como, por ejemplo, una deleción de 244-247 y/o 252-255 en SLT-1A o StxA. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende una mutación que es una deleción interna de todo el bucle sensible a escisión de proteasa expuesto a la superficie en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje, tal como, por ejemplo, para StxA y SLT-1A derivan polipéptidos efectores de toxina Shiga, una deleción de residuos de aminoácidos colocados de forma nativa 241-262; y para los polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de SLT-2A, una deleción de residuos de aminoácidos colocados de forma nativa 240-261.

[0472] En ciertas realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una mutación que es una deleción interna de residuos de aminoácidos dentro del motivo de escisión por furina como una mutación que es un truncamiento carboxi terminal en comparación con un Shiga de tipo salvaje. Subunidad de toxina A. En ciertas realizaciones adicionales, el motivo de escisión por furina alterado comprende tanto una mutación que es una deleción de residuo de aminoácido dentro del sitio mínimo de escisión por furina R/YxxR como una mutación que es un truncamiento carboxi terminal en comparación con un tipo salvaje, Subunidad A de toxina Shiga. Por ejemplo, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa pueden comprender un motivo de escisión por furina alterado que comprende mutación (es) que son deleciones de los restos de aminoácidos colocados de forma nativa 248-249 y/o 250-251 en un StxA o SLT truncado -1A polipéptido que todavía tiene restos

de aminoácidos 247 y/o 252, o los restos de aminoácidos 247-248 y/o 249-250 en un SLT-2A truncado que todavía tiene restos de aminoácidos 246 y/o 251. En las realizaciones, el motivo de escisión por furina alterado comprende una mutación que tiene una delección de cuatro residuos de aminoácidos consecutivos que elimina el sitio mínimo de escisión por furina R/YxxR y un truncamiento carboxi terminal en comparación con una toxina Shiga de tipo salvaje A Subunidad, tal como, por ejemplo, para polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de StxA y SLT-1A, truncamientos que terminan en la posición de residuo de aminoácido nativo 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291 o más y que carecen de R248-R251; y para los polipéptidos efectores de toxina Shiga derivados de SLT-2A, truncamientos que terminan en la posición de residuo de aminoácido nativo 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, o mayor y sin Y247-R250.

### C. Ejemplos de polipéptidos efectores de toxina Shiga que tienen un epítipo integrado

[0473] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención puede comprender uno o más epítipos de células T heterólogos, integrados o insertados para fines de desinmunización y/o suministro a una ruta de presentación de MHC de clase I de célula diana. Para ciertas realizaciones y/o ciertas subregiones del polipéptido efector de la toxina Shiga, puede preferirse la incrustación o incrustación parcial de un epítipo de células T en lugar de insertar un epítipo de células T porque, por ejemplo, las modificaciones de tipo de incrustación tienen más probabilidades de tener éxito en diversas subregiones de un polipéptido efector de toxina Shiga, mientras que las inserciones exitosas pueden estar más limitadas a un subconjunto más pequeño de subregiones del polipéptido efector de toxina Shiga. El término "exitoso" se usa aquí para referirse a la modificación del polipéptido efector de toxina Shiga (por ejemplo, la introducción de un epítipo heterólogo de células T) da como resultado un polipéptido efector de toxina Shiga modificado que retiene una o más funciones efectoras de toxina Shiga en el requisito nivel de actividad solo o como componente de una molécula de reconocimiento celular.

[0474] Cualquiera de las subregiones del polipéptido efector de toxina Shiga descritas en el documento WO 2015/113007 puede ser adecuada para ciertas realizaciones de la presente invención, y cualquiera de los polipéptidos efectores de toxina Shiga descritos en el documento WO 2015/113007 puede modificarse en un Shiga polipéptido efector de toxina de la presente invención, por ejemplo, mediante la adición de uno o más nuevos trastornos de la región del epítipo para la desinmunización (tal como se describe en el presente documento) y/o un trastorno del motivo de escisión por furina (como uno descrito aquí).

[0475] En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención consiste esencialmente en una subunidad truncada de la toxina A de Shiga que comprende un epítipo de células T heterólogo, integrado o insertado, y una o más mutaciones. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y es más pequeño que una Subunidad de toxina A Shiga de longitud completa, tal como, por ejemplo, que consiste en el polipéptido representado por aminoácidos 77 a 239 de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2) o el equivalente en otras Subunidades A de miembros de la familia de toxinas Shiga (por ejemplo, aminoácidos 77 a 238 de SLT-2A (SEQ ID NO: 3)). Por ejemplo, en ciertas realizaciones de la presente invención, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga se derivan de los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 1, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 1, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende al menos un epítipo de células T heterólogas integrado o insertado y al menos un aminoácido se interrumpe en una célula B endógena y/o región del epítipo de células T CD4 + proporcionada en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12) y en la que el aminoácido alterado no se solapa con el epítipo integrado o insertado. De manera similar en otras realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención se deriva de los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 2, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 2, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 2, o aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido efector de toxina Shiga comprende al menos un epítipo de células T heterólogas integrado o insertado y al menos un aminoácido se interrumpe en un endógeno, célula B y/o CD4 + Región del epítipo de células T proporcionada en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12) y en la que el aminoácido alterado no se solapa con el epítipo integrado o insertado. Además, el polipéptido efector de la toxina Shiga puede derivarse de los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 3, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 3, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 3, o los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende al menos un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y al menos un aminoácido se interrumpe en una región del epítipo endógeno, de células B y/o de células T CD4 + proporcionadas en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12) y en donde el aminoácido alterado no se solapa con el epítipo integrado o insertado. En ciertas realizaciones de la presente invención, el polipéptido efector de toxina Shiga comprende un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención se deriva de los aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, o los aminoácidos 1 a 261 de la SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende al menos un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxilo de un fragmento de toxina Shiga A1 región derivada De manera similar en otras realizaciones, el polipéptido efector de

toxina Shiga de la presente invención se deriva de los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 2, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 2, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 2, o aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 2, en donde el polipéptido efector de toxina Shiga comprende al menos un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de un fragmento de toxina Shiga A1 derivado región. Además, el polipéptido efector de la toxina Shiga puede derivarse de los aminoácidos 75 a 251 de la SEQ ID NO: 3, 1 a 241 de la SEQ ID NO: 3, 1 a 251 de la SEQ ID NO: 3, o los aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 3, en donde el polipéptido efector de toxina Shiga comprende al menos un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1.

#### D. Ejemplos de combinación de polipéptidos efectores de toxina Shiga

[0476] Una combinación de polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende dos o más subregiones (es decir, subregiones no superpuestas) en las que cada subregión comprende al menos uno de los siguientes: (1) una alteración en un epítipo o región del epítipo endógeno; (2) un epítipo-péptido de células T heterólogo integrado; (3) un epítipo-péptido de células T heterólogo insertado; y (4) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento A1.

[0477] Ciertas realizaciones de la combinación de polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención comprenden tanto (1) una alteración en un epítipo o región de epítipo endógeno como (2) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región derivada de fragmento A1. Se predice que cualquiera de las subregiones efectoras de toxina Shiga individuales, desimmunizadas, descritas en los Ejemplos a continuación o descritas en el documento WO 2015/113005 (véase, por ejemplo, la Tabla B, supra) puede combinarse generalmente con cualquier subregión efectora de toxina Shiga región que comprende un motivo de escisión por furina alterado descrito en este documento, descrito en WO 2015/191764, y/o conocido en la técnica con el fin de crear un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención.

[0478] En ciertas realizaciones de la presente invención, el polipéptido efector de toxina Shiga consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de las SEQ ID NO: 355-438 que comprende además una alteración de al menos un endógeno, célula B y/o región del epítipo de células T que no se solapa con un epítipo de células T CD8 + integrado o insertado; en donde la alteración comprende una o más sustituciones de residuos de aminoácidos en relación con una toxina Shiga de tipo salvaje. En ciertas realizaciones adicionales, la sustitución se selecciona del grupo que consiste en: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; D6 a A, G, V, L, I, F, S, Q y R; S8 a A, G, V, I, L, F y M; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; T12 a A, G, V, I, L, F, M, S y K; S12 a A, G, V, I, L, F y M; S33 a A, G, V, L, I, F, M y C; S43 a A, G, V, L, I, F y M; G44 a A o L; S45 a A, G, V, L, I, F y M; T45 a A, G, V, L, I, F y M; G46 a A y P; D47 a A, G, V, L, I, F, S, M y Q; N48 a A, G, V, L, M y F; L49 a A, V, C y G; Y49 a A, G, V, L, I, F, M y T; F50 a A, G, V, L, I y T; A51 a V; D53 a A, G, V, L, I, F, S y Q; V54 a A, G, I y L; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; G56 a A y P; 157 a A, G, V y M; L57 a A, V, C, G, M y F; D58 a A, G, V, L, I, F, S y Q; P59 a A, G y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, T y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; R84 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; V88 a A y G; 188 a A, V, C y G; D94 a A, G, V, L, I, F, S y Q; S96 a A, G, V, I, L, F y M; T104 a A, G, V, L, I, F, M; y N; A105 a L; T107 a A, G, V, L, I, F, M y P; S107 a A, G, V, L, I, F, M y P; L108 a A, V, C y G; S109 a A, G, V, I, L, F y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D111 a A, G, V, L, I, F, S, Q y T; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D141 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G147 a A; V154 a A y G. R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S y Q; L185 a A, G, V y C; S186 a A, G, V, I, L, F y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S189 a A, G, V, I, L, F y M; D198 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S. En ciertas realizaciones adicionales, hay múltiples alteraciones de múltiples regiones epótopos de células B endógenas y/o células T CD8 + en las que cada alteración implica al menos una sustitución de residuo de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en: K1 a A, G, V, L, I, F, M y H; T4 a A, G, V, L, I, F, M y S; D6 a A, G, V, L, I, F, S, Q y R; S8 a A, G, V, I, L, F y M; T9 a A, G, V, I, L, F, M y S; S9 a A, G, V, L, I, F y M; K11 a A, G, V, L, I, F, M y H; T12 a A, G, V, I, L, F, M, S y K; S12 a A, G, V, I, L, F y M; S33 a A, G, V, L, I, F, M y C; S43 a A, G, V, L, I, F y M; G44 a A o L; S45 a A, G, V, L, I, F y M; T45 a A, G, V, L, I, F y M; G46 a A y P; D47 a A, G, V, L, I, F, S, M y Q; N48 a A, G, V, L, M y F; L49 a A, V, C y G; Y49 a A, G, V, L, I, F, M y T; F50 a A, G, V, L, I y T; A51 a V; D53 a A, G, V, L, I, F, S y Q; V54 a A, G, I y L; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; G56 a A y P; 157 a A, G, V y M; L57 a A, V, C, G, M y F; D58 a A, G, V, L, I, F, S y Q; P59 a A, G y F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, T y R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M y R; G62 a A; R84 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; V88 a A y G; 188 a A, V, C y G; D94 a A, G, V, L, I, F, S y Q; S96 a A, G, V, I, L, F y M; T104 a A, G, V, L, I, F, M; y N; A105 a L; T107 a A, G, V, L, I, F, M y P; S107 a A, G, V, L, I, F, M y P; L108 a A, V, C y G; S109 a A, G, V, I, L, F y M; T109 a A, G, V, I, L, F, M y S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D111 a A, G, V, L, I, F, S, Q y T; S112 a A, G, V, L, I, F y M; D141 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G147 a A; V154 a A y G. R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; T180 a A, G, V, L, I, F, M y S; T181 a A, G, V, L, I, F, M y S; D183 a A, G, V, L, I, F, S y Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S y Q; L185 a A, G, V y C; S186 a A, G, V, I, L, F y M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S189 a A, G, V, I, L, F y M; D198 a A, G, V, L, I, F, S y Q; R204 a A, G,

V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; S247 a A, G, V, I, L, F y M; Y247 a A, G, V, L, I, F y M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K y H; D264 a A, G, V, L, I, F, S y Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M y S.

5 [0479] Ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención comprenden tanto (1) un epítipo-péptido de células T heterólogo integrado o insertado como (2) un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de un Región derivada del fragmento A1. Cualquiera de las subregiones del polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado descrito en los Ejemplos a continuación o en el documento WO 2015/113007 generalmente se puede combinar con cualquier sub-polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión de la proteasa. región (p. ej., subregiones de la subunidad A de la toxina Shiga modificada descrita en el presente documento, descrita en el documento WO 2015/191764, y/o conocida en la técnica) para crear una combinación, polipéptido efector de la toxina Shiga que, como componente de una célula molécula dirigida, es resistente a la escisión de la proteasa y capaz de administrar un epítipo heterólogo de células T a la vía de presentación MHC de clase I de una célula diana. Ejemplos no limitantes de este tipo de combinación de polipéptido efector de toxina Shiga se muestran en las SEQ ID NO: 6-27, 29-32, 340-355 y 370-438.

20 [0480] Ciertas realizaciones de la combinación de polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención comprenden tanto (1) una alteración en un epítipo o región de epítipo endógeno como (2) un péptido-epítipo de células T heterólogo integrado. Sin embargo, las subregiones efectoras de la toxina Shiga que comprenden epítopos de células T heterólogas insertadas o integradas descritas en el presente documento o en el documento WO 2015/191764 generalmente no se pueden combinar con todas las subregiones efectoras de la toxina Shiga desinmunizadas descritas en el presente documento, excepto donde se muestre empíricamente que se combinó con éxito de tal manera que la molécula de combinación resultante retuvo un nivel suficiente de una función o funciones efectoras de toxina Shiga. La divulgación en el presente documento muestra cómo se pueden realizar y probar tales realizaciones para demostrar empíricamente el éxito.

30 [0481] El término "exitoso" se usa aquí para significar que dos o más sustituciones de residuos de aminoácidos en un polipéptido efector de toxina Shiga dan como resultado una característica funcional, tal como, por ejemplo, desinmunización, escisión por furina reducida y/o capacidad para administrar un epítipo integrado o insertado, mientras que el polipéptido efector de toxina Shiga modificado retiene una o más funciones efectoras de toxina Shiga. Los enfoques y ensayos descritos en el presente documento muestran cómo diseñar, realizar y probar empíricamente realizaciones de la presente invención, que representan combinación, polipéptidos efectores de toxina Shiga y moléculas de reconocimiento celular que comprenden los mismos.

35 [0482] La combinación, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención combinan las características de sus respectivas subregiones, tales como, por ejemplo, una alteración del motivo de escisión por furina, alteraciones del epítipo individual y/o una carga de epítipo de células T heterólogas, y estas combinaciones a veces dan como resultado polipéptidos efectores de toxina Shiga con reducciones sinérgicas en la inmunogenicidad en comparación con la suma de sus subregiones parcialmente desinmunizadas. En particular, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de ejemplo mostrados en las SEQ ID NO: 13, 16 y 21 se desinmunizan sinérgicamente debido a la combinación de dos o más subregiones, una de las cuales comprende un epítipo de célula T heterólogo insertado y otro de los cuales comprende un epítipo endógeno alterado por una o más sustituciones de residuos de aminoácidos.

45 [0483] Para ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención comprende o consiste esencialmente en el polipéptido mostrado en una cualquiera de las SEQ ID NO: 6-32, 340-354 y 370-438. Para ciertas realizaciones, la combinación de polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión de la proteína desinmunizados que comprenden epítopos de células T integrados de la presente invención comprende o consiste esencialmente en uno de los polipéptidos representados por las SEQ ID NO: 6-10, 13-32, 340-354 y 370-438.

55 [0484] Los polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados de la presente invención que no presentan citotoxicidad o citotoxicidad reducida a ciertas concentraciones, por ejemplo, polipéptidos efectores de toxina Shiga que comprenden R179A, todavía pueden ser útiles como polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados para suministrar materiales exógenos en células. De manera similar, los polipéptidos efectores de toxina Shiga hiperinmunizados de células T CD8+ de la presente invención que no presentan citotoxicidad o citotoxicidad reducida a ciertas concentraciones, por ejemplo, un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un epítipo integrado en su dominio catalítico (véase, por ejemplo, WO 2015/113007, Ejemplo 1-F), aún puede ser útil para administrar un epítipo (s) de células T a un compartimento subcelular deseado de una célula en la que está presente el polipéptido efector de la toxina Shiga o como un componente de una molécula de reconocimiento celular para el suministro de un epítipo (s) de células T en una célula diana.

#### E. Ejemplos de moléculas de reconocimeinto celular de la presente invención

65

[0485] Los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención pueden usarse como componentes de moléculas de reconocimiento celular que se dirigen a diferentes biomoléculas diana extracelulares. Los siguientes ejemplos describen con más detalle ciertas estructuras de moléculas de reconocimiento celular de la presente invención que son células diana que expresan biomoléculas diana extracelulares tales como, por ejemplo, CD19, CD20, CD22, CD30, CD38, CD45, HER2, PD-L1 y TYRP1.

#### 1. Moléculas de reconocimiento celular dirigidas a CD19 humano

[0486] CD19, también reconocido en la técnica como B4, es una glucoproteína transmembrana de tipo I específica de linaje B de 95 kDa presente en la superficie de las células B en desarrollo pero no expresada por las células plasmáticas diferenciadas terminalmente. Si bien el nombre CD19 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de varias especies, a los efectos de los ejemplos estructurales de esta sección, el término "CD19" se refiere a las proteínas CD19 del antígeno de linfocitos B presentes en humanos cuya secuencia exacta puede variar ligeramente según la isoforma y de un individuo a otro. Con respecto a los humanos, CD19 se refiere a la proteína representada por la secuencia de polipéptidos predominante UniProt P15391 y el acceso al Instituto Nacional de Biotecnología, EE. UU. (NCBI) AAA69966.1 o AAB60697.1; sin embargo, existen diferentes isoformas y variantes debido a empalmes, polimorfismos y/o mutaciones (ver, por ejemplo, Kuroki K et al., Genes Immun Suppl 1: S21-30 (2002); Tsuchiya N et al., Arthritis Rheum 50: 4002-7 (2004); Dawidowicz K et al., Clin Exp Rheumatol 29: 839-42 (2011)). Un experto podrá identificar otras proteínas CD19 en humanos, incluso si difieren de las secuencias referenciadas.

[0487] CD19 es un objetivo atractivo para terapias dirigidas contra el cáncer, por ejemplo, debido a la expresión ubicua de CD19 en la superficie celular por células neoplásicas y tumores de linajes de células B. Por ejemplo, se encontró que la mayoría de las células B malignas expresaban CD19 (véase, por ejemplo, Anderson K et al., Blood 63: 1424 (1984); Uckun F et al., Blood 71: 13 (1988); Bradbury L et al., J Immunol 149: 2841-50 (1992); Haas K, Tedder T, Adv Exp Med Biol 560: 125-39 (2005); Tedder T, Nat Rev Rheumatol 5: 572-7 (2009)). Aunque CD19 se considera un marcador de células B pan expresado durante el desarrollo de las células B, se ha observado que las células B maduras y las células tumorales de linajes de células B expresan tres veces más CD19 en comparación con las células B inmaduras. En particular, se observó la expresión de CD19 en subtipos indolentes y agresivos de linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y formas de leucemia linfoblástica aguda. Además, debido a las diferencias en la expresión de CD19 en comparación con la expresión de CD20, las terapias dirigidas a CD19 pueden ser capaces de atacar las neoplasias de células B en las primeras etapas que las terapias dirigidas a CD20.

[0488] Existen numerosas regiones de unión a CD19 conocidas por el experto en la materia que pueden asociarse con un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención para crear una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Para los fines de la presente invención, el término "región de unión a CD19" se refiere a un resto molecular (por ejemplo, una molécula proteínica) o agente capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula de CD19 con alta afinidad, tal como, por ejemplo, con una constante de disociación con respecto a CD20 de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro. Como se usa en este documento, la unión a CD19 se refiere a la capacidad de unirse a una parte extracelular de una isoforma o variante de CD19 humano.

[0489] En ciertas realizaciones, la región de unión a CD19 es una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la región de unión a CD19 de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión a CD19 de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una parte extracelular de CD19. En ciertas otras realizaciones, la región de unión a CD19 de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido modificado no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión a CD19 de inmunoglobulina proporcionando una unión de alta afinidad a una parte extracelular de CD19. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias y/o regiones de unión a antígeno de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

[0490] Existen numerosas regiones de unión a CD19 contempladas como componentes de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de regiones de unión a CD19 de tipo inmunoglobulina incluyen anticuerpos monoclonales de unión a CD19 y derivados de los mismos, tales como variantes humanizadas y dominios de inmunoglobulina recombinante, por ejemplo, B4 (por ejemplo, clon eBio1D3), Leu-12 (Leu12), HD37, B43, Componentes CLB-CD19, MOPC 21, FMC63, MB19-1, cCD19, B4 89B, SJ25-C1, hA19, huB4, hBU12, XmAb5574, MOR208, MEDI-551, SAR3419, AFM11, GBR 401, XmAb 5871, Hm2E8b, B-1, 5F3, 2E2, 1G9, C-20, F-3, HD237, H-300, M-20, R-20, PDR134, BCE19, HIB19, LE-CD19, LT19, CB19, 6D5, 4G7, AB-1, F974A2, J3-119, MDX-1342, MAB7489 (clon 771404) y MAB4867 (clon 4G7-2E3) (ver, por ejemplo, Caligaris-Cappio F et al., J Clin Invest 76: 1243-51 (1985)); Chen Z y otros, Leuk Res 10: 1411-7 (1986); Pezzutto A y otros, J Immunol 138: 2793-9 (1987); De Rie M y otros, Leuk Res 12: 135-41 (1988); Uckun F y et al., Blood 71: 13-29 (1988); Vuist W y et al., Cancer Res 49: 3783-8 (1989); Carter R y et al., J Immunol 147: 3663-71 (1991); Zola H et al., Immunol Cell Biol 69: 411-22 (1991); Holder M y et al., Eur J Immunol 22: 2725-8 (1992); Engel P y et al., Immunity 3: 39-50 (1995); Pietersz G y et al., Cancer Immunol Immunother 41: 53-60 (1995); Tisone J y et al., Am J Clin Pathol 107: 283-91 (1997); WO

2005/012493; Lutz R y et al., Proc Am Assoc Cancer Res 47: 3731 (2006); Horton H y et al., Cancer Res 68: 8049-57 (2008); Gerber H et al., Blood 113: 4352-61 (2009); Awan F et al., Blood 115: 1204-13 (2010); Herbst R y et al., J Pharmacol Exp Ther 335: 213-22 (2010); Coiffier B y et al., J Clin Oncol 29: 1182-9 (2011); Reusch U y et al., Blood 122: 4405 (2013); Breton C y et al., J Hematol Oncol 7: 33 (2014); Horton H y et al., J Immunol 186: 4223-33 (2014); Shen D et al., Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 33: 215-20 (2014)). Los ejemplos no limitantes de regiones de unión a CD19 incluyen scFvs, tales como, por ejemplo, FVS191, FVS192, scFv-HD37, scFv-FMC63, HD37-C, HD37-CCH, FMC63-28Z, 4G7mut, 4G7-injerto (véase, por ejemplo, Bejeck B et al., Cancer Res 55: 2346-51 (1995); Kipriyanov et al., J Immunol Meth 196: 51-62 (1996); Nicholson I et al., Mol Immunol 34: 1157-65 (1997); WO 2002/050118; Peipp M et al., J Immunol Methods 285: 265-80 (2004); Cheng W et al., Biochim Biophys Acta 1768: 21-9 (2007); Kochenderfer J et al., J Immunother 32 : 689-702 (2009); Kügler M et al., Protein Eng Des Sel 22: 135-47 (2009); WO 2012/079000; Kneissi S et al., PLoS One 8: e79047 (2013)).

[0491] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a CD19 humano y/o la superficie celular de una célula CD19 +. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: a) un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende (i) un HABR1 que comprende o consiste esencialmente de una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 89 o SEQ ID NO: 96; (ii) un HABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 95 o SEQ ID NO: 97; y (iii) un HABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 91 o SEQ ID NO: 98; y b) un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende (i) un LABR1 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 92 o SEQ ID NO: 99 ; (ii) un LABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 93 o SEQ ID NO: 100; y (iii) un LABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 94, o SEQ ID NO: 101. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende la región de unión que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 1-232, 1-233, 1-234, 1-235, 1-236, 1-242, 1-243, 1-244, 1-245, 1-246, 1-252, 1-253, 1-254, 1-255 o 1-256 de cualquiera de las SEQ ID NO: 47-119 y 176-248.

[0492] Según un aspecto específico pero no limitante, la región de unión de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende un ligando (ya sea natural o sintético) o un derivado del mismo que retiene la funcionalidad de unión a una parte extracelular de CD19. Se sabe que el CD19 nativo se une al menos a un ligando, CD19-L, una proteína de caja del grupo de alta movilidad (HMG) (véase, por ejemplo, Uckun F et al., Br J Haematol 153: 15-23 (2011); US 20120141505).

[0493] Cualquiera de las moléculas de unión a CD19 mencionadas anteriormente puede ser adecuada para usar como una región de unión a CD19 o modificarse para crear una o más regiones de unión a CD19 para usar en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

## 2. Moléculas de reconocimiento celular dirigidas a CD20 humano

[0494] CD20 (antígeno de linfocitos B CD20) Aunque el nombre CD20 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de diversas especies, a los fines de los ejemplos estructurales de esta sección, el término "CD20" se refiere a B de antígeno de linfocitos CD20 presentes en humanos cuya secuencia exacta puede variar ligeramente según la isoforma y de un individuo a otro. Con respecto a los humanos, CD20 se refiere a la proteína representada por la secuencia de polipéptidos predominante UnitProt P11836 y la entrada NCBI NP 690605.1; sin embargo, existen diferentes isoformas y variantes debido a empalmes, polimorfismos y/o mutaciones (ver, por ejemplo, Dawidowicz K et al., Clin Exp Rheumatol 29: 839-42 (2011); Fang C et al., Int J Clin Exp Med 8 : 11235-43 (2015)). Un experto podrá identificar otras proteínas CD20 en humanos, incluso si difieren de las secuencias referenciadas.

[0495] CD20 es una glicoproteína de la superficie celular expresada por células normales de linaje de células B dentro de ciertas etapas de desarrollo celular, así como células de numerosas neoplasias de células B maduras, tales como NHL y células de leucemia linfocítica crónica (CLL). Además, CD20 se expresa mediante neoplasias de células T maduras y células NK. CD20 se expresa mediante un subconjunto de células T normales, así como de células T malignas como, por ejemplo, en linfomas de células T (TCL), incluyendo micosis fungoide (MF), linfoma de células asesinas naturales (linfoma de células NK), periférico Linfomas de células T (PTCL), linfomas cutáneos de células T y leucemia de linfocitos granulares grandes de células T (T-LGLL). La asociación del CD20 de la superficie celular con las células malignas lo convierte en un objetivo atractivo para las terapias de reconocimiento celular.

[0496] Existen numerosas regiones de unión a CD20 conocidas por el experto en la materia que pueden estar asociadas con un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención para crear una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Para los fines de la presente invención, el término "región de unión



a CD20" se refiere a un resto molecular (por ejemplo, una molécula proteica) o agente capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula de CD20 con alta afinidad, tal como, por ejemplo, tener una disociación constante con respecto a CD20 de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro. Como se usa en el presente documento, la unión a CD20 se refiere a la capacidad de unirse a una parte extracelular de una isoforma o variante de CD20 humano.

[0497] En ciertas realizaciones, la región de unión a CD20 es una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la región de unión a CD20 de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión a CD20 de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una parte extracelular de CD20. En ciertas otras realizaciones, la región de unión a CD20 de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido modificado genéticamente no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión a CD20 de inmunoglobulina proporcionando una unión de alta afinidad a una parte extracelular de CD20. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias y/o regiones de unión a antígeno de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

[0498] Existen numerosas regiones de unión a CD20 contempladas como componentes de la presente invención, tales como, por ejemplo, regiones de unión a CD20 descritas en PCT/US2016/016580. Los ejemplos no limitantes de regiones de unión a CD20 de tipo inmunoglobulina incluyen anticuerpos monoclonales y derivados (por ejemplo, variantes humanizadas y scFvs) tales como, por ejemplo, 1F5, 1H4, 1K1791, 2B8, Leu16, Leu $\delta$ , 2F2, 2H7, 7D8, 8E4, 11B8, AME-133v, LY2469298, B9E9, BM-ca, C2B8, CKI, GA101, RO5072759, LT20, ibritumomab, HB20-1-25, MB20-1-18, obinutuzumab, ocaratuzumab, ocrelizumab, PRO70769, ofMumumab, OMumumab, Oatumumab OUBM8, PRO131921, rituximab, TGLA, tositumomab, TRU-015, ublituximab, veltuzumab, IMMU-106, hA20, el dominio de fibronectina de unión a CD20 FN3CD20 y HL23 -scFvs: scFv-1, scFv-3, scFv-5, y scFv-8 (véase, por ejemplo, Golay J et al., J Immunol 135: 3795-801 (1985); Tedder T et al., Eur J Immunol 16: 881-7 (1986); Liu A et al., Proc Natl Acad Sci USA 84: 3439-43 (1987); Press O et al., Blood 69: 584-91 (1987); Maloney D et al., Blood 84: 2457-66 (1994); Reff M et al., Blood 83: 435-45 (1994); Hooijberg E y et al., Cancer Res 55: 840-6 (1995); Hooijberg E y et al., Hybridoma 15: 23-31 (1996); Anderson D y et al., Biochem Soc Trans 25: 705-8 (1997); Haisma H y et al., Blood 92: 184-90 (1998); Wiseman G y et al., Clin Cancer Res 5: 3281s-3286s (1999); Schultz J y et al., Cancer Res 60: 6663-9 (2000); Cardarelli P y et al., Cancer Immunol Immunother 51: 15-24 (2002); Cheson B, Curr Opin Investig Drugs 3: 165-70 (2002); Polyak M y et al., Blood 99: 3256-62 (2002); Teeling J et al., Blood 104: 1793-800 (2004); Geng S y et al., Cell Mol Immunol 3: 439-43 (2006); de Boer O y et al., PLoS One 2: e779 (2007); Burge D y et al., Clin Ther 30: 1806-16 (2008); Hagenbeek A y et al., Blood 111: 5486-95 (2008); Nishida M y et al., Intl J Oncol 32: 1263-74 (2008); Morschhauser F y et al., J Clin Oncol 27: 3346-53 (2009); Lim S y et al., Haematologica 95: 135-43 (2010); Lv M et al., Cancer Lett 294: 66-73 (2010); Morschhauser F y et al., Ann Oncol 21: 1870-6 (2010); Mössner E y et al., Blood 115: 4393-402 (2010); Olafsen T et al., Protein Eng Des Sel 23: 243-9 (2010); Uchiyama S y et al., Cancer Sci 101: 201-9 (2010); Wu L y et al., Cancer Lett 292: 208-14 (2010); Alduaij W y et al., Blood 117: 4519-29 (2011); Boross P y et al., Haematologica 96: 1822-30 (2011); Fang H et al., Sci China Life Sci 54: 255-62 (2011); Nickerson-Nutter C y et al., Rheumatology 50: 1033-44 (2011); Robak T, Robak E, BioDrugs 25: 13-25 (2011); Cang S y et al., J Hematol Oncol 5: 64 (2012); Salles G y et al., Blood 119: 5126-32 (2012); Abdelwahed R y et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 54: 3657-65 (2013); Golay J et al., Blood 122: 3482-91 (2013); Kinder M y et al., J Biol Chem 288: 3084-54 (2013); Kobayashi H et al., Cancer Med 2: 130-43 (2013); Natarajan A y et al., Clin Cancer Res 19: 6820-9 (2013); Zhang H y et al., Cell Physiol Biochem 32: 645-54 (2013); Ahmadzadeh V y et al., Protein Expr Purif 102: 45-41 (2014); Ellbrecht C y et al., JAMA Dermatol 1939 (2014); Garff-Tavernier M et al., Leukemia 28: 230-3 (2014); Patentes de los Estados Unidos 4.861.579; 5.500.362; 5.595.721; 5.677.180; 5.721.108; 5.736.137; 5.776.456; 5.843.398; 5.849.898; 6.015.542; 6.090.365; 6.120.767; 6.171.586; 6.194.551; 6.224.866; 6.242.195; 6.287.537; 6.306.393; 6.368.596; 6.399.061; 6.410.391; 6.455.043; 6.528.624; 6.538.124; 6.565.827; 6.652.852; 6.682.734; 7.879.984; 8.101.179; 8.153.125; 8.337.844; y publicaciones de solicitud de patente WO 1995/03770; WO 1998/58964; WO 1999/22764; WO 2000/09160; WO 2000/27428; WO 2000/27433; WO 2000/42072; WO 2000/44788; WO 2000/67795; WO 2000/67796; WO 2000/76542; WO 2001/03734; WO 2001/10460; WO 2001/10461; WO 2001/10462; WO 2001/13945; WO 2001/72333; WO 2001/80884; WO 2001/97858; WO 2002/060955; WO 2002/079255; WO 2002/096948; WO 2002/102312; WO 2003/002607; WO 2003/061694; WO 2004/032828; WO 2005/000901; WO 2005/016969; WO 2006/106959; WO 2009/031230; WO 2014/076292; US 2011/0091483; US 12/0941,583; PCT/US2010/055826; EP20140151932; PCT/GB2012/052532; US 13/048,135; EP20140151932; PCT/GB2012/052532; US 13/048,135; PCT/US2006/046034).

[0499] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a CD20 humano y/o la superficie celular de una célula CD20+. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido o polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en: a) un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende (i) una HCDR1 que comprende o consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 120, o SEQ ID NO: 124; (ii) una HCDR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID

NO: 103, SEQ ID NO: 115, o SEQ ID NO: 125; y (iii) una HCDR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 121, o SEQ ID NO: 126; y b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende (i) una LCDR1 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 127; (ii) una LCDR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 122, o SEQ ID NO: 128; y (iii) una LCDR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos tal como se muestra SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, o SEQ ID NO: 129. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 1-245 de cualquiera de las SEQ ID NO: 33, 64 y 65.

[0500] Cualquiera de las moléculas de unión a CD20 mencionadas anteriormente puede ser adecuada para su uso como una región de unión a CD20 o puede modificarse para crear una o más regiones de unión a CD20 para su uso en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

### 3. Moléculas de reconocimiento celular dirigidas a CD22 humano

[0501] CD22, también reconocido en la técnica como Siglec-2, SIGLEC2, BL-CAM, B3, Leu-14 y Lyb-8, es una glucoproteína transmembrana de aproximadamente 120-140 kDa (dependiendo del spliceoform) que se une a ligandos de ácido siálico. CD22 se expresa específicamente por las células B durante el desarrollo y por un subconjunto específico de células B maduras. Si bien el nombre CD22 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de diversas especies, a los efectos de los ejemplos estructurales de esta sección, el término "CD22" se refiere a proteínas de lectina de unión a ácido siálico presentes en humanos cuya secuencia exacta podría variar ligeramente según la isoforma y de un individuo a otro. Con respecto a los humanos, CD22 se refiere a la proteína representada por la secuencia de polipéptidos predominante UniProt P20273 y el acceso NCBI NP\_001265346.1; sin embargo, existen diferentes isoformas y variantes debido a empalmes, polimorfismos y/o mutaciones (véase, por ejemplo, Hitomi Y et al., Tissue Antigens 69: 242-9 (2007); Dawidowicz K et al., Clin Exp Rheumatol 29: 839-42 (2011)). Un experto podrá identificar otras proteínas CD22 en humanos, incluso si difieren de las secuencias referenciadas.

[0502] Un marcador específico de células B como, CD22 es una diana atractiva para las terapias dirigidas a células para las enfermedades y condiciones que implican las células B, tales como, por ejemplo, afecciones que implican células B hiperactivas, las poblaciones de células B elevadas, de células B enfermedades autoinmunes mediadas, leucemias y linfomas (véase, por ejemplo, Nitschke L, Glycobiology 24: 807-17 (2014)). Además, CD22 puede estar sobreexpresado por una variedad de células B malignas, como, por ejemplo, neoplasias de células B para las cuales la mayoría que se ha analizado expresa CD22 de superficie celular.

[0503] Existen numerosas regiones de unión a CD22 conocidas por el experto en la materia que pueden estar asociadas con un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención para crear una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Para los fines de la presente invención, el término "región de unión a CD22" se refiere a un resto molecular (por ejemplo, una molécula proteica) o agente capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula de CD22 con alta afinidad, tal como, por ejemplo, tener una disociación constante con respecto a CD22 de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro. Como se usa en este documento, la unión a CD2 se refiere a la capacidad de unirse a una parte extracelular de una isoforma o variante de CD22 humano.

[0504] En ciertas realizaciones, la región de unión a CD22 es una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la región de unión a CD22 de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión a CD22 de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una parte extracelular de CD22. En ciertas otras realizaciones, la región de unión a CD22 de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido modificado genéticamente no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión a CD22 de inmunoglobulina, proporcionando unión de alta afinidad a una parte extracelular de CD22. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias y/o regiones de unión a antígeno de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

[0505] Existen numerosas regiones de unión a CD22 contempladas como componentes de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de regiones de unión a CD22 de tipo inmunoglobulina incluyen anticuerpos monoclonales de unión a CD22 y derivados de los mismos, tales como variantes humanizadas y dominios de inmunoglobulina recombinante, por ejemplo, RFB4, alfa S-HCL-1 (alfa Leu-14), HD39, To15, 4KB128, HD37, EPB, HD6, LL2, HA22-LR, HB22.7, Hu10F4 (MCDT2219A o pinatuzumab), epratuzumab, inotuzumab, CAT-3888 (BL22), CAT-8015 (moxetumomab) y scFv-4KB128 (véase, por ejemplo, Campana D y et al., J Immunol 134: 1524-30 (1985); Schwarting R y et al., Blood 65: 974-83 (1985); Dorken B y et al., J Immunol 136: 4470-9 (1986); Mason D y et al., Blood 69: 836-40 (1987); Ghetie M y et al., Cancer Res 48: 2610-7 (1988); Pawlak-Byczkowska E y et al.,

Cancer Res 49: 4568- 77 (1989); Press O et al., Cancer Res 49: 4906-12 (1989); Stein R et al., Cancer Immunol Immunother 37: 293-8 (1993); Leung S et al., Hybridoma 13: 469 -76 (1994); WO 1994/027638; Leung S et al., Mol Immunol 32: 1413-27 (1995); WO 1998/041641; WO 2000/074718; Coleman M et al., Clin Cancer Res 9: 3991S-4S (2003); WO 2003/027135; WO 2003/072036; Arndt M y et al., FEBS Lett 578: 257-61 (2004); Furman et al., Curr Treat Options Oncol 5: 283-8 (2004); WO 2005/012493; Ho M et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 9637-42 (2006); US 7.074.403; WO 2008/070569; O'Donnell et al., Cancer Immunol Immunother 58: 1715-22 (2009); Mussai et al., Br J Haematol 150: 352-8 (2010); Polson A y et al., Leukemia 24: 1566-73 (2010); Wayne et al., Clin Cancer Res 16: 1894-903 (2010); Wong et al., Expert Opin Biol Ther 10: 1251-8 (2010); US 20140248278; JP201518404).

10 [0506] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad al CD22 humano y/o la superficie celular de una célula CD22 +. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: a) un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) que comprende (i) un HABR1 que comprende o consiste esencialmente de una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 142 o SEQ ID NO: 148; (ii) un HABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 143, o SEQ ID NO: 149; y (iii) un HABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 144 o SEQ ID NO: 150; y b) un dominio variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) que comprende (i) un LABR1 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 145, o SEQ ID NO: 151; (ii) un LABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 146, o SEQ ID NO: 152; y (iii) un LABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 147, o SEQ ID NO: 153. Alternativamente, las regiones de unión podrían describirse mediante CDR, que se superponen en gran medida con ABR y se describen en SEQ ID NO: 154-165. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 269-513 de la SEQ ID NO: 40 u 80.

30 [0507] Según un aspecto específico pero no limitante, la región de unión de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende un ligando (ya sea natural o sintético) o un derivado del mismo que conserva la funcionalidad de unión a CD22, tal como, p. Ej., ácidos siálicos, glicoconjugados que contienen ácido siálico y dominios de inmunoglobulinas tipo M (IgM) solubles (véase, por ejemplo, Bakker T et al., Eur J Immunol 32: 1924-32 (2002); Chen W et al., Blood 115 : 4778-86 (2010); Chen W et al., Leuk Lymphoma 53: 208-10 (2012); Schweizer A et al., Eur J Immunol 42: 2792-802 (2012)). Los ligandos de CD22 sintéticos con altas afinidades de unión se han diseñado y pueden usarse para el reconocimiento celular (véase, por ejemplo, Razi N, Varki A y et al., Proc Natl Acad Sci USA 95: 7469-74 (1998); Sliedregt L y et al., Bioorg Med Chem 9: 85-97 (2001); van Rossenberg S et al., J Biol Chem 276: 12967-73 (2001); Kelm S et al., J Exp Med 195: 1207-13 (2002); Collins B et al., J Immunol 177: 2994-3003 (2006); Yu J et al., Biochem Biophys Res Commun 360: 759-64 (2007); Abdu-Allah H et al., J Med Chem 51: 6665 -81 (2008); O'Reilly M et al., J Am Chem Soc 130: 7736-45 (2008); Abdu-Allah H et al., Bioorg Med Chem Lett 19: 5573-5 (2009); Chen W et al., Blood 115: 4778-86 (2010); Lepenies B et al., Curr Opin Chem Biol 14: 404-11 (2010); Abdu-Allah H et al., Bioorg Med Chem 19: 1966-71 (2011); Chen W et al., Leuk Lymphoma 53: 208-10 (2012); Mesch S et al., ChemMedChem 7: 134-43 (2012); Kelm S et al., Angew Chem Int Ed Engl 52: 3616 -20 (2013); Macauley M et al., J Clin Invest 123: 3074-83 (2013); Preshcer H et al., ACS Chem Biol 9: 1444-50 (2014)).

45 [0508] Cualquiera de las moléculas de unión a CD22 mencionadas anteriormente puede ser adecuada para usar como una región de unión a CD22 o modificarse para crear una o más regiones de unión a CD22 para usar en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

#### 50 4. Moléculas de reconocimiento celular dirigidas a CD30 humano

[0509] El CD30, también reconocido en la técnica como la superfamilia 8 del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF8) o Ki-1/120, es una glucoproteína transmembrana de tipo I de un tamaño de aproximadamente 90 a 120 kDa. CD30 funciona como un receptor de la superficie celular (o correceptor) de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral y se une a un ligando, CD30L. Un antígeno CD30 se describió por primera vez como un marcador de linfoma de Hodgkin clásico y células de Reed-Sternberg presentes en pacientes con enfermedad de Hodgkin (Schwab U et al., Nature 299: 65-7 (1982); Stein H et al., Int J Cancer 30: 445-459 (1982)), y el antígeno CD30 se observó más tarde en células de linfoma no Hodgkin (véase, por ejemplo, Stein H et al., Blood 66: 848-58 (1985)). Si bien el nombre CD30 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de varias especies, a los fines de los ejemplos estructurales de esta sección, el término "CD30" se refiere a las proteínas receptoras del factor de necrosis tumoral presentes en humanos cuya secuencia exacta podría variar ligeramente según la isoforma y de un individuo a otro. Con respecto a los humanos, CD30 se refiere a la proteína representada por la secuencia de polipéptidos predominante UniProt P28908 y el acceso a NCBI AAA51947.1; sin embargo, pueden existir diferentes isoformas y variantes debido a empalmes, polimorfismos y/o mutaciones. Un experto podrá identificar otras proteínas CD30 en humanos, incluso si difieren de las secuencias

referenciadas.

[0510] CD30 es una diana atractiva para la terapéutica de reconocimiento celular, por ejemplo, porque su expresión está restringida en gran medida a linfocitos activados y/o proliferantes y células malignas. En tejidos normales o inflamados, la expresión de CD30 se limita en gran medida a células B activadas de tamaño medio/grande y/o células T activadas que producen citocinas de tipo Th2 (Chiarle R et al., *Clin Immunol* 90: 157-64 (1990); Werner B et al., *J Cutan Pathol* 35: 1100-7 (2008); Buchan S, Al-Shamkhani A, *PLoS One* 7: e45244 (2012)). CD30 es altamente expresado por ciertos tipos de células, como, por ejemplo, ciertas células de linfoma, otras células linfoides malignas y células tumorales no linfoides, mientras que solo un subconjunto restringido de células sanas expresa CD30 y en niveles más bajos (Deutsch Y et al., *Leuk Lymphoma* 52: 1641-54 (2011)). CD30 es expresado por células involucradas en trastornos linfoproliferativos, neoplasias linfoides y neoplasias mieloides. Por ejemplo, CD30 se expresa en un subconjunto de células de linfoma no Hodgkin, incluidas las de Burkitt, células de linfoma anaplásico de células grandes (ALCL), linfomas de células T, células de linfoma de células T cutáneas, células de linfoma nodular de células hendidas pequeñas, linfocíticas células de linfoma, células de linfoma de células T periféricas, células de linfoma de Lennert, células de linfoma inmunoblástico, células de leucemidinfoma de células T (ATLL), leucemia de células T adultas (LLA-T), células de linfoma folicular centroblástico/centrocítico (cb/cc), y células de papulosis linfomatoide (véase, por ejemplo, Stein H y et al., *Blood* 66: 848-58 (1985); Stein y et al., *Neoplastic Hematopathology*, pág. 675, (Baltimore, Williams & Wilkins, Knowles D, ed.) (1985); Stein H et al., *Patología de los receptores de células y marcadores tumorales*, pg 121 (Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, Sefert G, Hubner K (eds) (1987); Suchi T et al., *J Clin Pathol* 40: 995 (1987); Eckert F et al., *Am J Dermatopathol* 11: 345-52 (1989); Moller P et al., *Am J Clin Pathol* 91: 18-23 (1989); Burns B, Dardick I, *Am J Clin Pathol* 93: 327-32 (1990); Piris M y et al., *Histopathology* 17: 211-8 (1990); Miettinen M, *Arch Pathol Lab Med* 116: 1197-201 (1992); Norduyn L y et al., *J Clin Pathol* 47: 33-7 (1994); Sabattini E et al., *Haematologica* 98: e8 1-2 (2013)). Se ha observado la expresión de CD30 en carcinomas embrionarios, carcinomas no embrionarios, melanomas malignos, tumores mesenquimatosos y líneas celulares mieloides y macrófagos en etapas tardías de diferenciación (véase, por ejemplo, Andreesen R et al., *Blood* 63: 1299-1302 (1984); Schaadt M et al., *Int Rev Exp Pathol* 27: 185-202 (1985); Stein H et al., *Haematol Blood Transfus* 29: 441-4 (1985); Froese P et al., *J Immunol* 139: 2081-7 (1987); Pallesen G, Hamilton-Dutoit S, *Am J Pathol* 133: 446-50 (1988); Andreesen R et al., *Am J Pathol* 134: 187-92 (1989); Hansen H et al., *Biol Chem Hoppe -Seyler* 370: 409-16 (1989); Schwarting R et al., *Blood* 74: 1678-89 (1989); Mechttersheimer G, Möller P, *Cancer* 66: 1732-7 (1990); Pallesen G, *Histopathology* 16: 409 -13 (1990); Dürkop H y et al., *Cell* 68: 421-7 (1992); Latza U y et al., *Am J Pathol* 146: 463-71 (1995)). La expresión de CD30 aparece regulada por células cebadas neoplásicas de neoplasias avanzadas, como las neoplasias involucradas en la mastocitosis y la mastocitosis sistémica (ver, por ejemplo, Soltar K et al., *Mod Pathol* 24: 585-95 (2011); Valent P et al., *Leuk Lymphoma* 52: 740-4 (2011)). También se ha informado que la expresión de CD30 aumenta en una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como, por ejemplo, neoplasias linfoides, neoplasias mieloides, alergias atópicas (dermatitis atópica, asma atópica, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica), lupus eritematoso sistémico, esclerosis sistémica (esclerodermia), enfermedad de injerto contra huésped, infección por VIH, infección por el virus de Epstein-Barr, sarampión, infección por mononucleosis, síndrome de Omen, colitis ulcerosa, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, psoriasis, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar primaria, síndrome de Sjögren, toxoplasmosis, Granulomatosis de Wegener y tuberculosis (véase, por ejemplo, Ralfkiaer E y et al., *Arch Dermatol Res* 279: 28-292 (1987); Romagnani S y et al., *J Leukocyte Biol* 57: 726-30 (1995); Gruss H y et al., *Immunol Today* 18: 156-63 (1997); Horie R, Watababe T, *Semin Immunol* 10: 457-70 (1998); Bengtsson A, *Allergy* 561: 593-603 (2001); Gerli R et al., *Trends Immunol* 22: 72-7 (2001)). La expresión de CD30 es un marcador de mastocitosis (véase, por ejemplo, Maric J, Calvo K, *Leuk Lymphoma* 52: 732-3 (2011)).

[0511] Existen numerosas regiones de unión a CD30 conocidas por el experto en la materia que pueden estar asociadas con un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención para crear una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Para los fines de la presente invención, el término "región de unión a CD30" se refiere a un resto molecular (por ejemplo, una molécula proteica) o agente capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula de CD30 con alta afinidad, tal como, por ejemplo, tener una disociación constante con respecto a CD30 de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro. Como se usa en este documento, la unión a CD30 se refiere a la capacidad de unirse a una parte extracelular de una isoforma o variante de CD30 humano.

[0512] En ciertas realizaciones, la región de unión a CD30 es una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la región de unión a CD30 de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión a CD30 de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una parte extracelular de CD30. En ciertas otras realizaciones, la región de unión a CD30 de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido modificado genéticamente no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión a CD30 de inmunoglobulina proporcionando una unión de alta afinidad a una parte extracelular de CD30. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias y/o regiones de unión a antígeno de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

[0513] Existen numerosas regiones de unión a CD30 contempladas como componentes de la presente

invención. Los ejemplos no limitantes de regiones de unión a CD30 de tipo inmunoglobulina incluyen anticuerpos monoclonales de unión a CD30 y derivados de los mismos, tales como variantes humanizadas y dominios de inmunoglobulina recombinante, por ejemplo, Ki-1, HeFi-1, Ber-H2, Ber-H4, Ber -H6, Ber-H8, Ber-H10, HRS-1, HRS-3, HRS-4, AC10, C10, Ki-2, Ki-3, Ki-4, Ki-5, Ki-6, Ki-7, M44, M67, scFv-Ki-4, scFv 4E3, T6, T7, T13, T14, T21, T24, T25, T104, T105, T107, T112, T201, T214, T215, T405, T406, T408, T411, T420, T426, T427 (véase, por ejemplo, Schwab U et al., Nature 299: 65-7 (1982); Hecht T et al., J Immunol 134: 4231-6 (1985); Schwarting R et al., Issue Sections . En: JA McMichael (ed.). Leucocyte Typing 3: 574-75. Oxford: Oxford University Press, (1987); Schwarting R et al., Leucocyte Typing IV: 419-22. Oxford, Reino Unido, Oxford University (1989).); Bowen M et al., J Immunol 151: 5896-906 (1993); Gruss H et al., Blood 83: 2045-56 (1994); Horn-Lohrens O et al., Int J Cancer 60: 539- 44 (1995); WO 1996/022384; Barth S et al., Blood 95: 3909-14 (2000); Klimka A y et al., Br J Cancer 83: 252-60 (2000); WO 2002/043661; WO 2003/059282; US 2004/018194; WO 2005/001038; WO 2007/040653; WO 2008/025020; WO 2015/028444).

[0514] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a CD30 humano y/o la superficie celular de una célula CD30 +. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: a) un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende (i) un HABR1 que comprende o consiste esencialmente de una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 178, o SEQ ID NO: 184; (ii) un HABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 179, o SEQ ID NO: 185; y (iii) un HABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 174 o SEQ ID NO: 180; y b) un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende (i) un LABR1 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 181 o SEQ ID NO: 186; (ii) un LABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 182, o SEQ ID NO: 187; y (iii) un LABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 183 o SEQ ID NO: 188. En ciertas realizaciones adicionales, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende la región de unión que comprende o que consiste esencialmente en los aminoácidos 268-500 de cualquiera de las SEQ ID NO: 452, 472, 487 y 503.

[0515] Según un aspecto específico pero no limitativo, la región de unión de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende un ligando (ya sea natural o sintético) o un derivado del mismo que retiene la funcionalidad de unión a una parte extracelular de CD30 (véase, por ejemplo, Powell I y et al., J Leukoc Biol 63: 752-7 (1998); Gruss H y et al., Eur J Immunol 25: 2083 (1995); Gattei V y et al., Leuk Lymphoma 35: 21-35 (1999); Zhang P y otros, Lab Invest 89: 1423-32 (2009); Parekh P y otros, Biomaterials 34: 8909-17 (2013); Shinoda K y otros, J Autoimmun 57: 14-23 (2015); WO 1993/024135).

[0516] Cualquiera de las moléculas de unión a CD30 mencionadas anteriormente puede ser adecuada para usar como una región de unión a CD30 o modificarse para crear una o más regiones de unión a CD30 para usar en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

#### 5. Moléculas de reconocimiento celular dirigidas a CD38 humano

[0517] CD38 es una proteína transmembrana caracterizada como un receptor de superficie celular y ADP ribosa hidrolasa cíclica extracelular (ADP-ribosilasa). Si bien el nombre CD38 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de varias especies, a los efectos de los ejemplos estructurales de esta sección, el término "CD38" se refiere a las proteínas cíclicas ADP ribosa hidrolasa presentes en humanos cuya secuencia exacta podría variar ligeramente según la isoforma y de un individuo a otro. Con respecto a los humanos, CD38 se refiere a la proteína representada por la secuencia de polipéptidos predominante UniProt P28907 y el acceso a NCBI BAA18964; sin embargo, pueden existir diferentes isoformas y variantes debido a empalmes, polimorfismos y/o mutaciones (véase, por ejemplo, Ferrero E y et al., Immunogenetics 49: 597-604 (1999); González-Escribano M y et al., Hum Immunol 65: 660- 664 (2004); Drummond F et al., J Bone Miner Metab 24: 28-35 (2006); Aydin S et al., Blood 111: 5646-53 (2008); WO 2006/099875). Un experto podrá identificar otras proteínas CD38 en humanos, incluso si difieren de las secuencias referenciadas.

[0518] Existen numerosas regiones de unión a CD38 conocidas por el experto en la materia que pueden estar asociadas con un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención para crear una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Para los fines de la presente invención, el término "región de unión a CD38" se refiere a un resto molecular (por ejemplo, una molécula proteínica) o agente capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula de CD38 con alta afinidad, tal como, por ejemplo, tener una disociación constante con respecto a CD38 de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro. Como se usa en este documento, la unión a CD38 se refiere a la capacidad de unirse a una parte extracelular de una isoforma o variante de CD38

humano.

[0519] En ciertas realizaciones, la región de unión a CD38 es una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la región de unión a CD38 de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión a CD38 de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una parte extracelular de CD38. En ciertas otras realizaciones, la región de unión a CD38 de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido modificado genéticamente no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión a CD38 de inmunoglobulina proporcionando una unión de alta afinidad a una parte extracelular de CD38. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias y/o regiones de unión a antígeno de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

[0520] Existen numerosas regiones de unión a CD38 contempladas como componentes de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de regiones de unión a CD38 de tipo inmunoglobulina incluyen anticuerpos monoclonales de unión a CD38 y scFv tales como, por ejemplo, daratumumab, isatuximab y MOR202 (véase, por ejemplo, Deaglio S et al., Trends Mol Med 14: 210-8 (2008) ; van de Donk N et al., Immunol Rev 270: 95-112 (2016); WO 1996/016990; WO 2002/006347; WO 2005/103083; WO 2008/047242; WO 2012/092612; WO 2012/092616; US20020164788; US20100285004; US 20150118251).

[0521] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a CD38 humano y/o la superficie celular de una célula CD38 +. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: a) un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende (i) un HADR1 que comprende o consiste esencialmente de una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 213, o SEQ ID NO: 219; (ii) un HADR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 208, SEQ ID NO: 214, o SEQ ID NO: 220; y (iii) un HADR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 215, o SEQ ID NO: 221; y b) un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende (i) un LABR1 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 216, o SEQ ID NO: 222; (ii) un LABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 217, o SEQ ID NO: 223; y (iii) un LABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 218, o SEQ ID NO: 224. Alternativamente, las regiones de unión podrían describirse mediante CDR, que se superponen en gran medida con ABR y se describen en SEQ ID NO: 225-242. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 269-499, 269-512, 269-513 o 280-510 de cualquiera de las SEQ ID NO: 34, 35, 41-56 y 82.

[0522] Se puede utilizar un ligando CD38 natural o derivado del mismo como la región de unión de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Se sabe que CD38 nativo se une al menos a un ligando, CD38L, una proteína Ig también conocida como molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas 1 (PECAM1) o CD31 (Cesano A et al., J Immunol 160: 1106-15 (1998); Deaglio S et al., J Immunol 160: 395-402 (1998)). CD31 o una parte de CD31 que interactúa con CD38 o un derivado del mismo puede fusionarse con los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la invención para construir moléculas dirigidas a CD38, dirigidas a células que se unen a una parte extracelular de CD38.

[0523] Cualquiera de las moléculas de unión a CD38 mencionadas anteriormente puede ser adecuada para su uso como una región de unión a CD38 o modificada para crear una o más regiones de unión a CD38 para su uso en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

## 6. Moléculas de reconocimiento celular dirigidas a CD45 humano

[0524] CD45, también reconocido en la técnica como PTPRC (proteína tirosina fosfatasa, tipo de receptor, C) y antígeno común leucocitario (LCA), es una transmembrana tipo I, proteína tirosina fosfatasa expresada en las superficies celulares de muchas células hematopoyéticas diferenciadas, especialmente células malignas hematológicas, tales como, por ejemplo, linfoma, leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), leucemia de células pilosas y células de leucemia no linfocítica aguda (AML). Si bien el nombre CD45 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de varias especies, a los efectos de los ejemplos estructurales de esta sección, el término "CD45" se refiere a las proteínas de la proteína tirosina fosfatasa presentes en humanos cuya secuencia exacta puede variar ligeramente basado en la isoforma y de individuo a individuo. Con respecto a los humanos, CD45 se refiere a la proteína representada por la secuencia de polipéptidos predominante UniProt Q6QIQ5 y, por ejemplo, el acceso NCBI NP\_563578.2 o NP\_002829.3; sin embargo, existen

diferentes isoformas y variantes debido a empalmes, polimorfismos y/o mutaciones (ver, por ejemplo, Motta-Mena L et al., J Biol Chem 286: 20043-53 (2011); Marmé F et al., Breast Cancer Res Treat 132 : 819-31 (2012); Pokoyski C et al., Genes Immun 16: 519-27 (2015)). Un experto podrá identificar otras proteínas CD45 en humanos, incluso si difieren de las secuencias referenciadas.

5 [0525] Existen numerosas regiones de unión a CD45 conocidas por el experto que pueden estar asociadas con un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención para crear una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Para los fines de la presente invención, el término "región de unión a CD45" se refiere a un resto molecular (por ejemplo, una molécula proteica) o agente capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula de CD45 con alta afinidad, tal como, por ejemplo, tener una disociación constante con respecto a CD45 de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro. Como se usa en el presente documento, la unión a CD45 se refiere a la capacidad de unirse a una parte extracelular de una isoforma o variante de CD45 humano.

15 [0526] En ciertas realizaciones, la región de unión a CD45 es una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la región de unión a CD45 de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión a CD45 de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una parte extracelular de CD45. En ciertas otras realizaciones, la región de unión a CD45 de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido modificado genéticamente no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión a CD45 de inmunoglobulina proporcionando una unión de alta afinidad a una parte extracelular de CD45. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias y/o regiones de unión a antígeno de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

25 [0527] Existen numerosas regiones de unión a CD45 contempladas como componentes de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de regiones de unión a CD45 de tipo inmunoglobulina incluyen anticuerpos monoclonales de unión a CD45 y scFv, tales como, por ejemplo, anti-CD45RB (véase, por ejemplo, Luke P et al., Curr Mol Med 1: 533-43 (2001); Lin Y et al., Cancer Res 66: 3884-92 (2006)).

30 [0528] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a CD45 humano y/o la superficie celular de una célula CD45 +. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: a) un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende (i) un HABR1 que comprende o consiste esencialmente de una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 243, SEQ ID NO: 249 o SEQ ID NO: 255; (ii) un HABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 250 o SEQ ID NO: 256; y (iii) un HABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 245, SEQ ID NO: 251 o SEQ ID NO: 257; y b) un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende (i) un LABR1 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 252 o SEQ ID NO: 258 ; (ii) un LABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 253, o SEQ ID NO: 259; y (iii) un LABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 248, SEQ ID NO: 254 o SEQ ID NO: 260.

45 [0529] Cualquiera de las moléculas de unión a CD45 mencionadas anteriormente puede ser adecuada para su uso como una región de unión a CD45 o modificada para crear una o más regiones de unión a CD45 para su uso en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

## 7. Moléculas de reconocimiento celular dirigidas a HER2 humano

50 [0530] HER2, también reconocido en la técnica como Receptor proteína tirosina quinasa erbB-2, es una proteína transmembrana que funciona como un receptor de la superficie celular para transducir señales a través de la membrana celular a reguladores intracelulares de la proliferación y apoptosis celular. HER2 también es reconocido en la técnica como Neu, erbB-2, p185, CD340, NGL y HER2/neu (Coussens L et al., Science 230: 1132-39 (1985); King C et al., Science 229: 974-6 (1985); Semba K et al., Proc Natl Acad Sci USA 82: 6497-501 (1985); Yamamoto T et al., Nature 319: 230-234 (1986); Kokai Y et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5389-93 (1988); Disis M et al., Cancer Res 54: 16-20 (1994); Yoshino I et al., J Immunol 152: 2393-400 (1994) ver, por ejemplo, GenBank Acc. Nos. X03363; M17730; NM\_004448; SEG\_HUMHER20). Si bien el nombre HER2 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de varias especies, a los efectos de los ejemplos estructurales de esta sección, el término "HER2" se refiere a las proteínas receptoras del factor de crecimiento epidérmico presentes en humanos cuya secuencia exacta podría variar ligeramente según la isoforma y de un individuo a otro. Por ejemplo, HER2 se refiere a la proteína humana representada por las secuencias de polipéptidos de ejemplo UniProt P04626 y accesiones NCBI NP\_004439.2, NP\_001005862.1, NP\_001276865.1, NP\_001276866.1 y NP\_001276867.1; sin embargo, existen diferentes isoformas y variantes debido a empalmes, polimorfismos y/o mutaciones (ver, por ejemplo, Siddig A et al., Ann NY Acad Sci 1138: 84-94 (2008); Poole E et al.,

Int J Mol Epidemiol Genet 2: 300-15 (2011); WO 2000/020579). Un experto podrá identificar otras proteínas HER2 en humanos, incluso si difieren de las secuencias referenciadas.

[0531] HER2 está sobreexpresado por muchas células cancerosas, especialmente las células de cáncer de mama, y su sobreexpresión está fuertemente asociada con un aumento de metástasis, aumento de la recurrencia de la enfermedad y mal pronóstico (véase, por ejemplo, Slamon D et al., Science 235: 177-82 (1987)).

[0532] Existen numerosas regiones de unión a HER2 conocidas por el experto en la materia que pueden estar asociadas con un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención para crear una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Para los fines de la presente invención, el término "región de unión a HER2" se refiere a un resto molecular (por ejemplo, una molécula proteínica) o agente capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula de HER2 con alta afinidad, tal como, por ejemplo, tener una disociación constante con respecto a CD20 de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro. Como se usa en el presente documento, la unión de HER2 se refiere a la capacidad de unirse a una parte extracelular de una isoforma o variante de HER2 humano.

[0533] En ciertas realizaciones, la región de unión de HER2 es una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la región de unión a HER2 de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión a HER2 de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una parte extracelular de HER2. En ciertas otras realizaciones, la región de unión a HER2 de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido modificado genéticamente no derivado de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una región de unión a HER2 de inmunoglobulina al proporcionar una unión de alta afinidad a una parte extracelular de HER2. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias y/o regiones de unión a antígeno de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

[0534] Hay numerosas regiones de unión a HER2 contempladas como componentes de la presente invención. Ejemplos no limitantes de regiones de unión a HER2 de tipo inmunoglobulina incluyen anticuerpos monoclonales de unión a HER2 y derivados de los mismos, tales como, por ejemplo, anti-ErbB2, 4D5, 2C4, 7F3, 7C2, mumAb 4D5, chmAb 4D5, (rhu) mAb 4D5, huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7, huMAb4D5-8, trastuzumab, humanizado 520C9, 4D5Fc8, sin bisagra rhu4D5, sin g4 residuos, pertuzumab y 2C4 humanizado (Hudziak R y et al., Mol Cell Biol 9: 1165-72 (1989); McKenzie S y et al., Oncogene 4: 543-8 (1989); Bacus S y et al., Molecular Carcinogenesis 3: 350-62 (1990); Hancock M et al., Cancer Res 51: 4575-80 (1991); Maier L et al., Cancer Res 51: 5361-5369 (1991); Stancovski I et al., Proc. Natl Acad Sci USA 88: 8691-5 (1991); Tagliabue E et al., Int J Cancer 47: 933-937 (1991); Bacus S et al., Cancer Res 52: 2580-9 (1992); Carter P et al., Proc Natl Acad Sci USA 89: 4285-89 (1992); Harwerth I y et al. J Biol Chem 267: 15160-7 (1992); Kasprzyk P y et al., Cancer Res 52: 2771-6 (1992); Lewis G y et al., Cancer Immunol Immunother 37: 255-63 (1993); Xu F y et al., Int J Cancer 53: 401-8 (1993); Arteaga C y et al., Cancer Res 54: 3758-65 (1994); Shawver L y et al., Cancer Res 54: 1367-73 (1994); Klapper L y et al. Oncogene 14: 2099-109 (1997); WO 1993/21319; WO 1994/00136; WO 1997/00271; WO 1998/77797; US 5,772,997; US 5,783,186; US 5.821.337; US 5,840,525; US 6,949,245; y US 7.625.859).

[0535] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a HER2 humano y/o la superficie celular de una célula HER2 +. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: a) un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende (i) un HABR1 que comprende o consiste esencialmente de una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 268 o SEQ ID NO: 274; (ii) un HABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 269 o SEQ ID NO: 275; y (iii) un HABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 270, o SEQ ID NO: 276; y b) un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende (i) un LABR1 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 271 o SEQ ID NO: 277; (ii) un LABR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 272 o SEQ ID NO: 278; y (iii) un LABR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 273 o SEQ ID NO: 279. Alternativamente, las regiones de unión podrían describirse mediante CDR, que se superponen en gran medida con ABR y se describen en SEQ ID NO: 283-303. En otras realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: a) un dominio variable ( $V_{HH}$ ) de cadena pesada que comprende (i) un HABR1 que comprende o que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 280; (ii) un HABR2 que comprende o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 281; y (iii) un HABR3 que comprende o que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 282. En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión comprende o consiste esencialmente en



los aminoácidos 269-520 o 269-521 de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 66 y 67.

[0536] Se puede utilizar un ligando natural o derivado del mismo como la región de unión de HER2 para una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Se sabe que HER2 nativo se heterodimeriza con otros miembros de la familia ErbB al unirse ligandos como factores de crecimiento epidérmico como epiregulina y heregulina (Moasser M, *Oncogene* 26: 6469-87 (2007); Riese D, Cullum R, *Semin Cell Dev Biol* 28 : 49-56 (2014); Sollome J et al., *Cell Signal* 26: 70-82 (2014)). Los ligandos ErbB que se unen a miembros de la familia ErbB incluyen EGF, TGF- $\alpha$ , amphiregulina, betacelulina, HB-EGF, epiregulina, HER2-68 y HER2-100, heregulinas, herstatina, NRG-2, NRG-3 y NRG-4 (Justman Q et al., *J Biol Chem* 277: 20618-24 (2002); Jhabvala-Romero F., et al., *Oncogene* 22: 8178-86 (2003)). Los ejemplos de un ligando ErbB incluyen las heregulinas (HRG), tales como el prototipo de heregulina descrito en la patente de los Estados Unidos 5.641.869 y Marchionni M et al., *Nature* 362: 312-8 (1993). Los ejemplos de heregulinas incluyen heregulina- $\alpha$ , heregulina- $\beta$ 1, heregulina- $\beta$ 2 y heregulina- $\beta$ 3 (Holmes W et al., *Science* 256: 1205-10 (1992); US 5.641.869); factor de diferenciación de neu (NDF) (Peles et al., *Cell* 69: 205-16 (1992)); actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA) (Falls D et al., *Cell* 72: 801-15 (1993)); factores de crecimiento glial (GGF) (Marchionni M et al., *Nature* 362: 312-8 (1993)); factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF) (Ho W et al., *J Biol Chem* 270: 14523-32 (1995));  $\gamma$ -heregulina (Schaefer G et al., *Oncogene* 15: 1385-94 (1997)).

[0537] Un ligando ErbB según la presente invención también puede ser un ligando ErbB sintético. El ligando sintético puede ser específico para un receptor ErbB particular, o puede reconocer complejos particulares del receptor ErbB. Un ejemplo de un ligando sintético es la birregulina sintética de heregulina/EGF quimera (Jones J et al., *FEBS Lett*, 447: 227-31 (1999)) y el fragmento de dominio similar a EGF HRG $\beta$ 1177-244. Los ligandos de ErbB o una parte de un ligando de ErbB que interactúa con HER2 o un derivado del mismo pueden fusionarse con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la invención para construir moléculas de la invención dirigidas a HER2 que se unen a una parte extracelular de HER2.

[0538] Los péptidos sintéticos que se unen a una parte extracelular de HER2 pueden utilizarse como la región de unión para el direccionamiento. Muchos péptidos se han descrito, que son capaces de unirse a HER2 (ver patentes por ejemplo, US 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 US 2011/0059090).

[0539] En ciertas realizaciones, las moléculas pequeñas que se unen a una parte extracelular de HER2 pueden utilizarse como la región de unión para el direccionamiento. Se han descrito muchas moléculas pequeñas que son capaces de unirse a HER2, como los inhibidores de tirosina quinasa, AZD8931, lapatinib, neratinib (HKI-272), dacomitinib (PF-00299804), afatinib (BIBW 2992) (Barlaam B et al., *ACS Med Chem Lett* 4: 742-6 (2013); Yu H, Riley G, *J Natl Compr Canc Netw* 11: 161-9 (2013); Roskoski R, *Pharmacol Res* 87C: 42-59 (2014)). Se pueden identificar otras moléculas pequeñas que se unen a una parte extracelular de HER2 utilizando procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia, tales como derivatizando ligantes EGFR conocidos como gefitinib, erlotinib, AEE788, AG1478, AG1571 (SU-5271), AP26113, CO-1686, XL647, vandetanib y BMS-690514 (Kurokawa H, Arteaga C, *Clin Cancer Res* 7: 4436s-4442s (2001); Yigitbasi O et al., *Cancer Res* 64: 7977-84 (2004); Yu H, Riley G, *J Natl Compr Canc Netw* 11: 161-9 (2013); Roskoski R, *Pharmacol Res* 87C: 42-59 (2014)).

[0540] Cualquiera de las moléculas de unión a HER2 mencionadas anteriormente puede ser adecuada para usar como una región de unión a HER2 o modificarse para crear una o más regiones de unión a HER2 para usar en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención

#### 8. Moléculas de reconocimiento celular dirigidas a PD-L1 humana

[0541] PD-L1, también reconocido en la técnica como PDL1, muerte celular programada 1 ligando 1, PDCD1 Ligando 1, PDCD1L1, PDCD1LG1, B7 homólogo 1 (B7-H1) y CD274, es un ligando para la muerte celular programada -1 receptor de células T y B (Dong H et al., *Nat Med* 5: 1365-9 (1999); Freeman G et al., *J Exp Med* 192: 1027-34 (2000); Latchman Y et al., *Nat Immunol* 2: 261-8 (2001)) y el receptor B7-1 y el receptor CD80 encontrados en las células T (Butte M et al., *Immunity* 27: 111-22 (2007); Park J et al., *Blood* 116: 1291-8 (2010)). Si bien el nombre PD-L1 podría referirse a múltiples proteínas con estructuras relacionadas y secuencias de polipéptidos de varias especies, a los fines de los ejemplos estructurales de esta sección, el término "PD-L1" se refiere a los ligandos PD-1 presentes en humanos cuyos La secuencia exacta puede variar ligeramente según la isoforma y de un individuo a otro. Con respecto a los humanos, PD-L1 se refiere a la proteína representada por la secuencia de polipéptidos predominante UniProt Q9NZQ7 o Q9EP73 y el acceso a NCBI AAI13735.1; sin embargo, existen diferentes isoformas y variantes debido a empalmes, polimorfismos y/o mutaciones (ver, por ejemplo, Abelson A et al., *Genes Immun* 8: 69-74 (2007); Wang S et al., *J Clin Immunol* 27: 563-7 (2007); Hayashi M et al., *Eur J Endocrinol* 158: 817-22 (2008); Mitchell A et al., *J Clin Endocrinol Metab* 94: 5139-45 (2009); Yang Q et al., *Clin Exp Rheumatol* 29: 13-8 (2011); Ma Y et al., *Int J Clin Exp Med* 15: 16585-91 (2015)). Un experto podrá identificar otras proteínas PD-L1 en humanos, incluso si difieren de las secuencias referenciadas.

[0542] PD-L1 está ausente de la mayoría de los tejidos sanos en condiciones normales; sin embargo, la expresión de PD-L1 puede ser inducida por la exposición de la mayoría de las células de mamíferos nucleados a un interferón (s) (ver, por ejemplo, Dong H et al., *Nat Med* 8: 793-800 (2002); Chen L, *Nat Rev Immunol* 4 : 336-47 (2004); Hirano F et al., *Cancer Res* 65: 1089-96 (2005); Zou W, Chen L, *Nat Rev Immunol* 8: 467-7 (2008); Flies D et al., *Yale J Biol Med* 84: 409-21 (2011); Chen J et al., *Immunobiology* 217: 385-93 (2012); Spranger S et al. *Sci Transl Med* 5: 200ra116 (2013)). Durante ciertas neoplasias malignas, la regulación positiva de PD-L1 en microambientes tumorales puede conducir a una supresión excesiva de las respuestas inmunitarias a las células tumorales, lo que se ajusta a las nociones comunes sobre la participación de PD-L1 en la resistencia inmune adaptativa de las células tumorales al sistema inmunitario del huésped (ver, por ejemplo, Zou W, Chen L, *Nat Rev Immunol* 8: 467-7 (2008); Zheng P, Zho Z, *Biomark Cancer* 7: 15-8 (2015)).

[0543] PD-L1 es un objetivo atractivo para las terapias porque PD-L1 se expresa fuertemente por ciertas células tumorales y linfocitos infiltrantes de tumores, mientras que las células y tejidos humanos sanos rara vez expresan altos niveles de PD-L1 en una superficie celular (véase, por ejemplo, Dong H et al., *Nat Med* 8: 793-800 (2002); Chen L, *Nat Rev Immunol* 4: 336-47 (2004); Hirano F et al., *Cancer Res* 65: 1089-96 (2005); Chen L, Han X, *J Clin Invest* 125: 3384-91 (2015)). En humanos, se ha observado la expresión de PD-L1 de la superficie celular por células tumorales en varias biopsias tumorales primarias y células cultivadas de células tumorales evaluadas por inmunohistoquímica, incluyendo células y tejidos relacionados, por ejemplo, con carcinomas, gliomas, células B linfomas, leucemia/linfoma de células T en adultos (ATLL), linfomas de células T angioinmunoblásticos (AITL), cánceres de vejiga, leucemias linfocíticas crónicas (CLL), neoplasias epiteliales, carcinomas de células escamosas orales, carcinomas de células escamosas esofágicas (cáncer de pulmón), linfomas no Hodgkin (NHL), cánceres pancreáticos, carcinomas de células renales (RCC), linfomas linfocíticos pequeños (SLL), carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) y neoplasias asociadas a virus (ver, por ejemplo, Brown J et al. al., *Immunol* 170: 1257-66 (2003); Strome S et al., *Cancer Res* 63: 6501-5 (2003); Winterle et al., *Cancer Res* 63: 7462-7 (2003); Thompson R et al. ., *Cancer Res* 66: 3381-5 (2006); Nomi T et al., *Clin Cancer Res* 13: 2151-7 (2007); Thompson et al., *Clin Cancer Res* 13: 1757-61 (2007); Andorsky D y et al., *Clin Cancer Res* 17: 4232-44 (2011); Chen B y et al., *Clin Cancer Res* 19: 3462-73 (2013); Chen M et al., *Oncotarget* 7: 7913-24 (2016); Wu C et al., *Sci Rep.* 6: 19740 (2016)).

[0544] Existen numerosas regiones de unión a PD-L1 conocidas por el experto en la materia que pueden estar asociadas con un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención para crear una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Para los fines de la presente invención, el término "región de unión a PD-L1" se refiere a un resto molecular (por ejemplo, una molécula proteínica) o agente capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de una molécula de PD-L1 con alta afinidad, como por ejemplo, que tiene una constante de disociación con respecto a PD-L1 de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles por litro. Como se usa en el presente documento, la unión de PD-L1 se refiere a la capacidad de unirse a una parte extracelular de una isoforma o variante de PD-L1 humana.

[0545] En ciertas realizaciones, la región de unión de PD-L1 es una región de unión de tipo inmunoglobulina. En ciertas realizaciones, la región de unión a PD-L1 de tipo inmunoglobulina se deriva de una región de unión a PD-L1 de inmunoglobulina, tal como un paratopo de anticuerpo capaz de unirse a una parte extracelular de PD-L1. En ciertas otras realizaciones, la región de unión a PD-L1 de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido modificado que no deriva de ningún dominio de inmunoglobulina pero que funciona como una inmunoglobulina, región de unión a PD-L1 al proporcionar una unión de alta afinidad a una parte extracelular de PD-L1. Este polipéptido modificado puede incluir opcionalmente armazones de polipéptidos que comprenden o consisten esencialmente en regiones determinantes complementarias y/o regiones de unión a antígeno de inmunoglobulinas como se describe en el presente documento.

[0546] Existen numerosas regiones de unión a PD-L1 contempladas como componentes de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de regiones de unión a PD-L1 de tipo inmunoglobulina incluyen numerosos anticuerpos y dominios de inmunoglobulina que ya se sabe que se unen a una parte extracelular de PD-L1 presente en una superficie celular incluyen MDX-1105, MOM-18534-S (P), y varios scFvs (véase, por ejemplo, Latchman Y et al., *Nat Immunol* 2: 261-8 (2001); Xerri L et al., *Human Pathol* 39: 1050-8 (2008); Chen B et al., *Clin Cancer Res* 19: 3462-73 (2013); Drees J et al., *Protein Expr Purif* 94: 60-6 (2014); WO 2007/005874; WO 2010/036959; WO 2013/019906; US 7,943,743; US 8,552,154; US 9,102,727 ; US 9.273.135, y las solicitudes de patente de los Estados Unidos US20110271358 y US20160075782).

[0547] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende una región de unión que comprende un polipéptido de tipo inmunoglobulina seleccionado para la unión específica y de alta afinidad a PD-L1 humano y/o la superficie celular de un PD-L1 + célula. En ciertas realizaciones de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: a) un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende (i) un HCDR1 que comprende o consiste esencialmente de una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 304, SEQ ID NO: 310, SEQ ID NO: 316, SEQ ID NO: 322, o SEQ ID NO: 328; (ii) un HCDR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en S SEQ ID NO: 305, SEQ ID

NO: 311, SEQ ID NO: 317, SEQ ID NO: 323, o SEQ ID NO: 329 ; y (iii) un HCDR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 306, SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 318, SEQ ID NO: 324, o SEQ ID NO: 330 ; y b) un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende (i) una LCDR1 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 307, SEQ ID NO: 313, SEQ ID NO: 319, SEQ ID NO: 325, o SEQ ID NO: 331; (ii) un LCDR2 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 308, SEQ ID NO: 314, SEQ ID NO: 320, SEQ ID NO: 326 o SEQ ID NO: 332; y (iii) un LCDR3 que comprende o que consiste esencialmente en una de las secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 309, SEQ ID NO: 315, SEQ ID NO: 321, SEQ ID NO: 327, o SEQ ID NO: 333 . En ciertas realizaciones adicionales, la región de unión comprende o consiste esencialmente en los aminoácidos 269-498 o 269-499 de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-39, 68-79 y 81.

[0548] Cualquiera de las moléculas de unión a PD-L1 mencionadas anteriormente puede ser adecuada para usar como una región de unión a PD-L1 o modificarse para crear una o más regiones de unión a PD-L1 para usar en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención.

#### Otras variaciones estructurales

[0549] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión se ha descrito previamente, por ejemplo, en WO 2005/092917, WO 2007/033497, US2009/0156417, JP4339511, EP1727827, DE602004027168, EP1945660, JP4934761, EP2228383, US2013/0196928, WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, US20150259428, 62/168,758, 62/168,759, 62/168,760, 62/168,761, 62/168,762, 62/168,763 y PCT/US2016/016580.

[0550] En ciertas realizaciones adicionales de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la región de unión comprende un polipéptido (s) seleccionado del grupo que consiste en: (a) un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) que comprende un HCDR1 que comprende o que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 334, un HCDR2 que comprende o consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos como se muestra en HCDR2 y un HCDR3 que comprende o consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 336; y (b) un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) que comprende un LCDR1 que comprende o que consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 337, un LCDR2 que comprende o consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 338, y un LCDR3 que comprende o consiste esencialmente en las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 339.

[0551] Está dentro del alcance de la presente invención usar fragmentos, variantes y/o derivados de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención que contienen un sitio de unión funcional a cualquier parte extracelular de una biomolécula diana, y aún más preferiblemente capaz de unirse a una biomolécula diana con alta afinidad (por ejemplo, como se muestra por  $K_D$ ). Por ejemplo, cualquier región de unión que se una a una parte extracelular de una biomolécula diana con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro, preferiblemente menos de 200 nM, puede ser sustituida para su uso en la fabricación de células moléculas dirigidas a la invención y procedimientos de la invención.

[0552] El experto en la materia reconocerá que se pueden hacer variaciones a los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y a las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, y a los polinucleótidos que codifican cualquiera de los primeros, sin disminuir sus actividades biológicas, por ejemplo, manteniendo la estructura general y la función del polipéptido efector de la toxina Shiga, como en conjunto con uno o más 1) interrupciones del epítipo endógeno que reducen el potencial antigénico y/o inmunogénico, 2) alteraciones del motivo de escisión por furina que reducen la escisión proteolítica, y/o 3) incrustadas o Epítopos insertados que reducen el potencial antigénico y/o inmunogénico o que pueden ser administrándose a una molécula de MHC I para su presentación en una superficie celular. Por ejemplo, algunas modificaciones pueden facilitar la expresión, facilitar la purificación, mejorar las propiedades farmacocinéticas y/o mejorar la inmunogenicidad. Dichas modificaciones son bien conocidas por el experto e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino terminal para proporcionar un sitio de iniciación, aminoácidos adicionales colocados en cualquiera de los extremos para crear sitios de restricción o codones de terminación convenientemente situados, y etiquetas de afinidad bioquímica fusionado a cualquiera de los terminales para proporcionar una detección y/o purificación conveniente. Una modificación común para mejorar la inmunogenicidad de un polipéptido producido usando un sistema no cordal (por ejemplo, una célula procarionota) es eliminar, después de la producción del polipéptido, el residuo de metionina de partida, que puede formarse durante la producción, como por ejemplo, en un sistema huésped bacteriano, porque, por ejemplo, la presencia de N-formilmetionina (fMet) podría inducir respuestas inmunes indeseables en los cordados.

[0553] También se contempla en el presente documento la inclusión de residuos de aminoácidos adicionales en los extremos amino y/o carboxi de un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención, una molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o un componente proteínico de una célula moléculas de

direccionamiento de la presente invención, tales como secuencias para etiquetas de epítomos u otros restos. Los residuos de aminoácidos adicionales se pueden usar para diversos fines que incluyen, por ejemplo, facilitar la clonación, facilitar la expresión, la modificación postraduccional, facilitar la síntesis, la purificación, facilitar la detección y la administración. Ejemplos no limitantes de etiquetas y restos de epítomos son dominios de proteínas de unión a quitina, sitios de escisión de enteropeptidasa, sitios de división de Factor Xa, etiquetas FIAsH, etiquetas FLAG, proteínas fluorescentes verdes (GFP), restos glutatión-S-transferasa, etiquetas HA, proteína de unión a maltosa dominios, 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 epítomo V5.

[0554] En algunas de las realizaciones anteriores, la secuencia de polipéptidos de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y/o las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención varían en una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos introducidas en la (s) región (es) de polipéptido siempre ya que todas las características estructurales requeridas todavía están presentes y el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir cualquier función requerida, ya sea solo o como un componente de una molécula de reconocimiento celular. Como se usa en el presente documento, el término "sustitución conservadora" denota 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 C). Un ejemplo de una sustitución conservadora con un residuo que normalmente no se encuentra en péptidos y proteínas endógenos de mamíferos es la sustitución conservadora de un residuo de arginina o lisina con, por ejemplo, ornitina, canavanina, aminoetilcisteína u otro aminoácido básico. Para más información sobre sustituciones fenotípicamente silenciosas en péptidos y proteínas, véase, por ejemplo, Bowie J et al., Science 247: 1306-10 (1990).

25 TABLA C. Ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos

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

[0555] En el esquema de sustitución conservadora de la Tabla C, 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 asociada a cicloalqueno, X hidrofóbica, XI polar, XII pequeña, XIII con giro y XIV flexible. Por ejemplo, las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen lo siguiente: 1) S puede ser sustituido por C; 2) M o L pueden ser sustituidos por F; 3) Y puede ser sustituido por M; 4) Q o E pueden ser sustituidos por K; 5) N o Q pueden ser sustituidos por H; y 6) H puede ser sustituido por N.

[0556] Las sustituciones conservadoras de aminoácidos adicionales incluyen lo siguiente: 1) S puede ser sustituido por C; 2) M o L pueden ser sustituidos por F; 3) Y puede ser sustituido por M; 4) Q o E pueden ser sustituidos por K; 5) N o Q pueden ser sustituidos por H; y 6) H puede ser sustituido por N.

[0557] En ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden comprender fragmentos funcionales o variantes de una región de polipéptidos de la presente invención descrita en el presente documento 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 aquí, siempre que (1) comprenda al menos un epítomo de células T heterólogo integrado o insertado y en al menos un aminoácido se altera en una región del epítomo endógeno de células B y/o células T CD4 + proporcionada en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12), en donde el aminoácido roto no se solapa con el integrado o epítomo insertado; (2) comprende al menos un epítomo de células T heterólogo integrado o insertado y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1; o (3) comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 y comprende que al menos un aminoácido se interrumpe en una región epítomo

endógena de células B y/o células CD4 + proporcionadas en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12), en donde el aminoácido alterado no se solapa con el motivo de escisión por furina alterado. Las variantes de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la invención están dentro del alcance de la presente invención como resultado de cambiar un polipéptido descrito en el presente documento alterando uno o más residuos de aminoácidos o eliminando o insertando uno o más residuos de aminoácidos, como dentro de la región de unión o la región del polipéptido efector de la toxina Shiga, para lograr las propiedades deseadas, tales como citotoxicidad cambiada, efectos citostáticos cambiados, inmunogenicidad cambiada y/o semivida sérica cambiada. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden estar además con o sin una secuencia señal.

[0558] Por consiguiente, en ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención comprenden o consisten esencialmente en secuencias de aminoácidos que tienen al menos 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99%, identidad de secuencia global a una subunidad A de toxina Shiga de origen natural o un fragmento de la misma, como, por ejemplo, subunidad A de toxina Shiga, como SLT-1A (SEQ ID NO : 1), StxA (SEQ ID NO: 2), y/o SLT-2A (SEQ ID NO: 3), en donde el polipéptido efector de la toxina Shiga (1) comprende al menos un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y al menos un aminoácido se interrumpe en una región del epítipo endógeno de células B y/o células T CD4 + proporcionadas en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12), y en donde el aminoácido alterado no se solapa con el epítipo integrado o insertado; (2) comprende al menos un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado y un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1; o (3) comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 y comprende al menos un aminoácido que está alterado en una región epítipo endógena de células B y/o células CD4 + proporcionadas en los Ejemplos (véanse, por ejemplo, las Tablas 1-7 y/o 12), y en donde el aminoácido alterado no se solapa con el motivo de escisión por furina alterado.

[0559] En ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención, uno o más residuos de aminoácidos pueden mutarse, insertarse o eliminarse para aumentar la actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga. En ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención, uno o más residuos de aminoácidos pueden mutarse o eliminarse para reducir o eliminar la actividad catalítica y/o citotóxica del polipéptido efector de la toxina Shiga. Por ejemplo, la actividad catalítica y/o citotóxica de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede verse disminuida o eliminada por mutación o truncamiento.

[0560] La citotoxicidad de las subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga puede ser alterada, reducida o eliminada por mutación y/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 Slt-I A1 en un ensayo de inactivación de ribosomas sin células (LaPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)). En otro enfoque que utiliza la expresión de novo de Slt-I A1 en el retículo endoplásmico, la mutación de glutamato-167 y arginina-170 eliminó la citotoxicidad del fragmento Slt-I A1 a ese nivel de expresión (LaPointe P et al., 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 et al., J Bacteriol 175: 4970-8 (1993)). Un fragmento truncado de Slt-I A1 que contiene los residuos 1-239 mostró una actividad enzimática significativa in vitro y citotoxicidad por expresión de novo en el citosol (LaPointe P et al., 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 al citosol (LaPointe P et al., J Biol Chem 280: 23310-18 (2005)).

[0561] Los residuos más críticos para la actividad y/o la citotoxicidad enzimática en los Shiga toxina A Subunidades fueron asignadas a los siguientes residuos posiciones: asparagina-75, tirosina-77, tirosina-114, glutamato 167, arginina-170, arginina -176 y triptófano-203 entre otros (Di R et al., 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 de ribosomas eucariotas y/o inhibición de ribosomas eucariotas en la subunidad A de toxina Shiga se han mapeado en las siguientes posiciones de residuos arginina-172, arginina-176, arginina-179, arginina-188, tirosina-189, valina -191 y leucina-233 entre otros (McCluskey A et al., PLoS One 7: e31191 (2012)). Sin embargo, ciertas modificaciones pueden aumentar la actividad funcional de la toxina Shiga exhibida por un polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención. Por ejemplo, la mutación de la posición de residuos alanina-231 en Stx1A a glutamato aumentó la actividad enzimática de Stx1A in vitro (Suhan M, Hovde C, Infect Immun 66: 5252-9 (1998)).

[0562] En ciertas realizaciones de polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención derivados de SLT-1A (SEQ ID NO: 1) o StxA (SEQ ID NO: 2), el uno o más residuos de aminoácidos mutados 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 conocerán ejemplos de tales sustituciones trabajador basado en la técnica anterior, tal como asparagina en la posición 75 a alanina, tirosina en la posición 77 a serina, sustitución de la tirosina en la posición 114 a serina, sustitución de la posición glutamato 167 a glutamato, sustitución de la arginina en la posición 170 a alanina, sustitución de la arginina en la posición 176 a lisina, sustitución del triptófano en la posición 203 a alanina, y/o sustitución de la alanina en 231 con glutamato. Otras mutaciones que potencian o reducen la actividad enzimática y/o la citotoxicidad de la toxina Shiga están dentro del alcance de la invención y pueden determinarse usando técnicas y ensayos bien conocidos descritos en este documento.

[0563] Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención se pueden conjugar opcionalmente con uno o más agentes adicionales, que pueden incluir agentes terapéuticos, agentes de diagnóstico y/u otros materiales exógenos adicionales conocidos en la técnica, que incluyen tales agentes como se describen en este documento. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga o la molécula de reconocimiento celular de la presente invención está PEGilada o albuminizada, tal como, por ejemplo, para proporcionar desinmunización, interrumpir la escisión por furina enmascarando el bucle extendido y/o la escisión por furina el motivo en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1, mejora las propiedades farmacocinéticas y/o mejora la inmunogenicidad (véase, por ejemplo, Wang Q et al., Cancer Res 53: 4588-94 (1993); Tsutsumi Y et al., Proc Natl Acad Sci USA 97: 8548-53 (2000); Buse J, El-Aneed A, Nanomed 5: 1237-60 (2010); Lim S et al., J Control Release 207-93 (2015)).

#### V. Funciones generales de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención

[0564] La asociación funcional de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención con las regiones de unión a la orientación celular permite la creación de moléculas dirigidas a la célula que matan selectivamente, inhiben el crecimiento, administraciónn material exógeno y/o detectan tipos celulares específicos . Las propiedades del polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención permiten la creación de moléculas de reconocimiento celular con ventanas terapéuticas mejoradas en los cordados en comparación con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga anteriores.

[0565] Para ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención proporciona, después de la administración a un cordado, uno o más de los siguientes: 1) destrucción potente y selectiva de células diana, por ejemplo, células infectadas o malignas, a baja dosis de administración, 2) estabilidad de enlace entre la región de unión de reconocimiento celular y la región del polipéptido efector de toxina Shiga mientras la molécula de reconocimiento celular está presente en espacios extracelulares, 3) bajos niveles de muertes celulares fuera del objetivo y/o daño tisular no deseado, y 4) suministro dirigido a células de epítomos heterólogos de células T CD8 + para su presentación por las células diana con el fin de iniciar respuestas inmunes deseables, mediadas por células T, tales como, por ejemplo, el reclutamiento de células T CD8 + y la liberación localizada de citoquinas en un locus de tejido.

[0566] Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son útiles en diversas aplicaciones que implican, por ejemplo, la destrucción de células; inhibición del crecimiento celular; intracelular, administración de carga; recopilación de información biológica; estimulación de la respuesta inmune y/o remediación de una condición de salud. Los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención son útiles como componentes de diversas moléculas terapéuticas y/o de diagnóstico, tales como, por ejemplo, fusiones de ligando-toxina, inmunotoxinas y/o inmunoconjugados. Las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son útiles como moléculas terapéuticas y/o diagnósticas, tales como, por ejemplo, como moléculas terapéuticas dirigidas a células, citotóxicas; vehículos de administración dirigidos a células, no tóxicos; y/o de reconocimiento celular, moléculas de diagnóstico; por ejemplo, en aplicaciones que involucran la focalización in vivo de tipos de células específicas para el diagnóstico o tratamiento de una variedad de enfermedades, incluidos cánceres, trastornos inmunes e infecciones microbianas.

[0567] Dependiendo de la realización, un polipéptido efector de toxina Shiga o una molécula de reconocimiento celular de la presente invención puede tener o proporcionar una o más de las siguientes características o funcionalidades: (1) desinmunización, (2) resistencia a la escisión de proteasa, (3) citotoxicidad potente a ciertas concentraciones, (4) administración intracelular de una carga que consiste en un material adicional (por ejemplo, un epítomo heterólogo de células T), (4) citotoxicidad selectiva, (6) baja toxicidad fuera del objetivo en multicelular organismos a ciertas dosis o dosis, (7) administración de un epítomo heterólogo de células T a la vía de presentación MHC clase I de una célula diana, y/u (8) estimulación de la respuesta o respuestas inmunitarias de células T CD8 +. Ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son multifuncionales porque las moléculas tienen dos o más de las características o funcionalidades descritas aquí. Ciertas realizaciones adicionales de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención proporcionan todas las características y funcionalidades mencionadas anteriormente en una sola

molécula.

5 [0568] La asociación, el acoplamiento y/o la unión de una región o regiones de unión a la dirección celular con un polipéptido (s) efector de la toxina Shiga de la presente invención permite la ingeniería de moléculas de la dirección celular con función (es) de la toxina Shiga que puede producir menos efectos adversos después de la administración a ciertas dosis o dosis a un organismo multicelular como un mamífero. Los ejemplos no limitantes de efectos adversos incluyen toxicidades fuera del objetivo, citotoxicidades no dirigidas y/o respuestas inmunes no deseadas. Ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son particularmente útiles en aplicaciones que implican la administración de un polipéptido efector de la toxina Shiga y/o la molécula de reconocimiento celular a un cordado debido a propiedades funcionales, tales como, por ejemplo, desinmunización, toxicidades reducidas fuera del objetivo y/o estimulación dirigida de respuestas inmunes deseadas, tales como a través de la presentación en la superficie celular de una molécula de reconocimiento celular administrada, epítipo de células T CD8 +.

15 [0569] En ciertas realizaciones, las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son capaces de unir biomoléculas diana extracelulares asociadas con la superficie celular de tipos celulares particulares y entrar en esas células. Una vez internalizado dentro de un tipo de célula diana, ciertas realizaciones de las moléculas de objetivo celular de la invención son capaces de dirigir un fragmento de polipéptido efector de la toxina Shiga enzimáticamente activo, citotóxico, hacia el citosol de la célula diana y eventualmente matar la célula. Alternativamente, las variantes no tóxicas o de toxicidad reducida de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden usarse para suministrar materiales exógenos adicionales a las células diana, tales como epítopos, péptidos, proteínas, polinucleótidos y agentes promotores de detección. Este sistema es modular, ya que se puede usar cualquier número de regiones de unión diversas para dirigir un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención a diversos tipos de células diversas.

25 A. Desinmunización para aplicaciones que implican la administración a un cordado

30 [0570] La desinmunización de los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención se lleva a cabo mediante alteraciones de ingeniería de uno o más regiones de epítopos endógenos, de células B y/o de células T CD4 + de una subunidad A de toxina Shiga o toxina Shiga polipéptido efector, incluso mediante mutación y/o truncamiento o mediante la conjugación de una estructura química unida covalentemente. Debido a que los epítopos de células B a menudo coinciden o se superponen con los epítopos de células T CD4 + maduras, la alteración de una región de epítipo de células B endógena a menudo altera simultáneamente un epítipo de células T CD4 + endógeno o viceversa.

35 [0571] Ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención se desinmunizan con respecto a uno o más epítopos de células B y/o células T CD4 +, lo que significa que estas moléculas exhiben antígeno y/o potencial inmunogénico en comparación con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga anteriores y las moléculas de reconocimiento celular que carecen de alteraciones idénticas a las mismas regiones de epítipo o epítipo de células T CD4 + y/o carecen de cualquier alteración a la misma célula B y/o epítipo (s) de células T CD4 + o región (es) de epítipo. Ciertas realizaciones adicionales exhiben niveles potentes, si no de tipo salvaje, de citotoxicidad dependiente del dominio catalítico de la subunidad A de la toxina Shiga a pesar de la presencia de mutaciones múltiples que proporcionan la propiedad desinmunizada. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son útiles para aplicaciones que implican la administración parenteral de un polipéptido efector de la toxina Shiga y/o la molécula de reconocimiento celular a un cordado como, por ejemplo, un mamífero, anfibios, aves, peces, reptiles o tiburones, debido a la probabilidad reducida de producir respuestas inmunes indeseables invocadas por la molécula administrada.

50 [0572] Los diversos polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados de la presente invención pueden diferir en sus perfiles de antigenicidad cuando se administran a varias especies de cordados, pero todos los polipéptidos desinmunizados de la invención exhiben una antigenicidad y/o inmunogenicidad reducida en al menos un organismo medido por al menos un ensayo cuantitativo. En particular, ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención se desinmunizan con respecto a un receptor mamífero, tal como, por ejemplo, la molécula invoca cantidades y/o frecuencias más bajas de anticuerpos de "molécula de reconocimiento celular anti" cuando se administra a ese mamífero en comparación con una molécula de referencia (por ejemplo, una molécula relacionada con la dirección celular que comprende un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje). Además, se espera que los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención que tienen interrupciones de múltiples regiones endógenas del epítipo reduzcan en gran medida la probabilidad de la aparición de respuestas inmunes indeseables en un receptor cordal de dicho polipéptido.

60 [0573] Para ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la (s) propiedad (es) de desinmunización es el resultado de los cambios estructurales que incluyen el motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1.

[0574] Para ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, la (s) propiedad (es) de desinmunización es el resultado de los cambios estructurales que incluyen la inclusión y/o inserción de un Epítipo de células T que altera una región de epítipo endógeno, de células B y/o de células T CD4 +.

[0575] Para ciertas realizaciones, se conservan las funciones biológicas deseadas del polipéptido de toxina Shiga parental del que se deriva el polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado, tales como, por ejemplo, la subunidad A de la toxina Shiga funciones de promoción internalización celular, enrutamiento intracelular directo y citotoxicidad potente. La conservación se refiere a la retención de un nivel mínimo de actividad como se describe en este documento.

#### B. Sensibilidad reducida de escisión por proteasa

[0576] Ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención exhiben una sensibilidad reducida a la escisión de la proteasa en comparación con las moléculas relacionadas que comprenden regiones de fragmentos de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje. Ciertas realizaciones adicionales exhiben citotoxicidad dependiente del dominio catalítico dependiente de la subunidad A de la toxina Shiga potente a pesar de esta sensibilidad reducida de escisión de proteasa y la falta de un evento de escisión por furina canónico dentro de una célula intoxicada.

[0577] Ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular resistentes a la escisión por proteasa de la presente invención (es decir, una molécula de reconocimiento celular que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxilo de su toxina Shiga A1 región de fragmentos) exhiben una tolerabilidad in vivo mejorada en comparación con moléculas relacionadas que comprenden una región de fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje. Ciertas realizaciones adicionales exhiben citotoxicidad dependiente del dominio catalítico dependiente de la subunidad A de la toxina Shiga potente a pesar de esta sensibilidad reducida de escisión de proteasa y la falta de un evento de escisión por furina canónico dentro de una célula intoxicada.

[0578] Anteriormente, se creía que los constructos citotóxicos de la subunidad A de la toxina Shiga que comprenden regiones catalíticas del fragmento A1 de la toxina Shiga deben mantener o compensar de alguna manera el procesamiento proteolítico natural de la furina dentro de las células intoxicadas para preservar las adaptaciones naturales de la toxina Shiga para una eficacia y potente citotoxicidad. Se descubrió inesperadamente que el evento de escisión por furina no era necesario para una citotoxicidad potente porque la potente citotoxicidad de la toxina Shiga al nivel de una construcción de control de toxina Shiga de tipo salvaje se logró en ausencia de cualquier evento de escisión por furina en el extremo carboxi de la Shiga fragmento de toxina A1 a pesar de la presencia de un resto carboxi-terminal (ver Ejemplos, infra y WO 2015/191764). La falta de un evento de escisión por furina dentro de la célula intoxicada puede evitar la liberación eficiente de una región similar a un fragmento de toxina Shiga A1 y, por lo tanto, dar como resultado la unión continua de un resto relativamente grande (por ejemplo, de más de 28 kDa) la región del fragmento de toxina Shiga A1. Sin embargo, a pesar de esta posibilidad, se logró una potente citotoxicidad de la toxina Shiga con construcciones deficientes en la escisión por furina que comprenden una región de polipéptido efector de la toxina Shiga y que carecen de cualquier característica compensatoria conocida, como, por ejemplo, proporcionar escisión intracelular proximal al extremo carboxi terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1 (ver Ejemplos, infra; WO 2015/191764).

[0579] Esto sugiere que la persistencia y/o la liberación ineficiente de un resto molecular relativamente grande unido a la región del fragmento A1 no redujo necesariamente la potencia de la citotoxicidad de la toxina Shiga. Esto fue sorprendente porque se pensó que el proceso óptimo de intoxicación por toxina Shiga requería la liberación de los fragmentos A1 de la toxina Shiga de todos los demás restos moleculares grandes para volver a trasladar eficientemente los fragmentos A1 liberados desde el retículo endoplásmico al citosol, donde los fragmentos A1 pueden formar una estructura enzimáticamente activa. que inactiva catalíticamente los ribosomas de la célula intoxicada. En particular, se esperaba que la persistencia y/o la liberación ineficiente de un resto molecular relativamente grande que cubriera el extremo carboxi del fragmento de la toxina Shiga A1 interfiriera con el mecanismo natural del fragmento de la toxina Shiga A1 para acceder de manera eficiente al citosol, que implica el exposición del dominio del fragmento A1, hidrófobo, carboxi-terminal y reconocimiento de este dominio por el sistema ERAD (ver Di R et al., *Toxicon* 57: 525-39 (2011); Li S et al., *PLoS One* 7: e41119 (2012)).

[0580] La falta de un evento de escisión por furina mediada por células intoxicadas para una molécula que comprende un derivado de la subunidad A de toxina Shiga puede compensarse hipotéticamente. Los ejemplos no limitantes de posibles enfoques compensatorios incluyen 1) terminar un extremo carboxi terminal de la construcción con el extremo carboxi terminal de una región de polipéptido similar a un fragmento de la toxina Shiga A1, 2) producir la construcción derivada de la toxina Shiga de tal manera que la toxina Shiga A El polipéptido de la subunidad ya está cortado cerca del extremo carboxi terminal de su polipéptido similar a un fragmento de toxina Shiga A1, 3) diseñando un sitio de proteasa heterólogo y/o ectópico que puede sustituir funcionalmente la falta de la



toxina Shiga nativa, evento de escisión por furina, y 4) una combinación de enfoque 3 y 4.

[0581] En el primer enfoque, el extremo carboxi del polipéptido similar al fragmento de la toxina Shiga A1 no está cubierto por ningún resto carboxilo terminal, y, por lo tanto, el extremo carboxi del polipéptido similar al fragmento de la toxina Shiga A1 está permanentemente expuesto para reconocimiento por la maquinaria ERAD en el retículo endoplásmico. En los últimos tres enfoques, el polipéptido similar a un fragmento de la toxina Shiga A1 puede diseñarse para disociarse intracelularmente de uno o más componentes del constructo cuando la molécula alcanza el retículo endoplásmico de una célula intoxicada de modo que en el retículo endoplásmico el carboxi -terminus del polipéptido tipo fragmento de la toxina Shiga A1 queda expuesto para su reconocimiento por la maquinaria ERAD. Por ejemplo, una molécula citotóxica que comprende un polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga podría pretratarse con una proteasa para cortar la región del polipéptido cerca del extremo carboxilo de la región similar a un fragmento A1 antes de contactar una célula diana. Alternativamente, la molécula citotóxica podría diseñarse para comprender un sitio de proteasa que es escindido por una proteasa intracelular de la célula diana.

[0582] Estos enfoques hipotéticos para diseñar polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga que compensan la falta de un evento de escisión por furina mediado por células intoxicadas pueden alterar significativamente la eficiencia y la potencia de la citotoxicidad en comparación con una holotoxina Shiga de tipo salvaje o Shiga toxina Una construcción de subunidad que comprende solo secuencias de tipo salvaje que incluyen el sitio óptimo de corte natural de furina. Por ejemplo, actualmente no se conoce un enfoque compensatorio que dependa de una endoproteasa de células diana que no sea furina que pueda proporcionar una citotoxicidad completamente compensatoria equivalente a la escisión por furina y se ha demostrado que las proteasas alternativas a furina como calpaínas son menos eficientes para facilitar la citotoxicidad de la toxina Shiga (Garred O et al., Exp Cell Res 218: 39-49 (1995); Garred O et al., J Biol Chem 270: 10817-21 (1995); Kurmanova A et al., Biochem Biophys Res Commun 357: 144-9 (2007)).

[0583] La presente invención proporciona resistente toxina Shiga polipéptidos efectoras furina de escisión de una subunidad que son potentemente citotóxico, ya sea debido a la compensación de la falta de un evento de escisión por furina dentro de la célula intoxicada o debido a alguna razón no explicada. Ciertas moléculas que se dirigen a las células de la presente invención son al menos tan eficiente y potentemente citotóxicas como las moléculas que se dirigen a las células que comprenden regiones de polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje sensibles a la escisión de la proteasa (ver Ejemplos, infra).

### C. Estabilidad y tolerabilidad in vivo mejoradas

[0584] En ciertas realizaciones, las moléculas de la presente invención (por ejemplo, las moléculas de reconocimiento celular de la invención) exhiben mayor estabilidad y/o tolerabilidad in vivo mejorada en comparación con más análogos sensibles a la escisión por furina y/o análogos menos inmunizados (un análogo es una molécula estrechamente relacionada que carece de una o más características estructurales de la presente invención).

[0585] La mayor estabilidad de una molécula de reconocimiento celular en comparación con una molécula de referencia puede exhibirse in vitro y/o in vivo. La estabilidad de una molécula terapéutica o diagnóstica a lo largo del tiempo es una característica importante y puede afectar para qué aplicaciones la molécula puede emplearse prácticamente. La estabilidad molecular incluye in vitro e in vivo, como, por ejemplo, la estabilidad dentro de un organismo después de la administración y durante el almacenamiento en un rango de temperaturas y concentraciones. Para ciertas fusiones de inmunotoxinas o ligando-toxina, la estabilidad del enlace entre la toxina y otros componentes puede afectar la cantidad de toxicidad no específica causada por la presencia y/o cantidad de toxina no dirigida en el tiempo dentro del organismo.

[0586] Ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención exhiben una toxicidad no específica reducida in vivo, manifestada como una mayor tolerabilidad in vivo en comparación con variantes más sensibles a la escisión de proteasa. La tolerabilidad in vivo puede ser determinada por el experto utilizando técnicas conocidas en la técnica y/o descritas aquí. Además de evaluar la tolerabilidad in vivo usando la mortalidad, se pueden usar signos de morbilidad para evaluar la tolerabilidad in vivo, tales como, por ejemplo, aspectos del peso corporal, apariencia física, signos clínicos medibles, comportamiento no provocado y respuestas a estímulos externos (véase, por ejemplo, Morton D, Griffiths P, Vet Rec 116: 431-43 (1985); Montgomery C, Cancer Bull 42: 230-7 (1990); Ullman-Culleré M, Foltz C, Lab Anim Sci 49: 319-23 (1999) ; Clingerman K, Summers L, J Am Assoc Lab Anim Sci 51: 31-6 (2012)). La eutanasia se puede usar en respuesta a signos de morbilidad y/o morbilidad y, por lo tanto, crear un punto temporal de mortalidad. Por ejemplo, una disminución en el peso corporal del 15-20% en 2-3 días puede usarse como un signo de morbilidad en los roedores y como justificación para la eutanasia (consulte, por ejemplo, la Guía del Instituto de Investigación Animal de Laboratorio 2011. para el cuidado y uso de animales de laboratorio, 8ª ed., Washington, DC, EE. UU. : National Academies Press).

[0587] La mejora in vivo tolerabilidad observada para de ejemplo, dirige a una célula moléculas de la presente invención en comparación con los análogos sensibles más furina-escisión sugiere que dosis mucho más altas de estas moléculas de reconocimiento celular de la invención pueden administrarse de forma segura a mamíferos como

5 en comparación con las dosis de moléculas relacionadas que comprenden una región polipeptídica efectora de toxina Shiga sensible a la escisión por furina. Ciertas moléculas que se dirigen a las células de la invención pueden exhibir una toxicidad no específica reducida en comparación con variantes más sensibles a la proteasa porque la resistencia a la proteasa sirve para proteger y preservar el enlace entre el componente efector de la toxina Shiga y el componente del resto dirigido a la célula.

10 [0588] Además, la tolerabilidad in vivo para las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención puede estar relacionada con las propiedades de desinmunización de una molécula de reconocimiento celular dada. Por lo tanto, las dosis más altas de tales moléculas de inmunización dirigidas a células de la invención pueden administrarse de manera segura a mamíferos en comparación con las dosis de moléculas relacionadas que comprenden un polipéptido efector de la toxina Shiga "no desinmunizado" o menos desinmunizado. (p. ej., un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje).

15 [0589] Además, ciertas moléculas de la invención exhiben vidas medias aumentadas, tanto in vitro como in vivo, en comparación con variantes más sensibles a la escisión de proteasas. La estabilidad molecular se puede analizar determinando la vida media de una molécula de interés con respecto a la asociación de sus componentes. Ciertas realizaciones de las moléculas de la invención tendrán vidas medias más largas en comparación con las variantes sensibles a la escisión por furina, especialmente con respecto a la asociación continua del componente del polipéptido efector de la toxina Shiga y uno o más componentes. Por ejemplo, ciertas realizaciones de las moléculas de la invención tendrán semividas más largas con respecto a la asociación continua del componente del polipéptido efector de la toxina Shiga y otro componente, por ejemplo, una región de unión de reconocimiento celular, en comparación con una escisión sensible a la furina variante en la que el sitio o los sitios sensibles a la escisión por furina se encuentran entre esos dos componentes.

#### 25 D. Eliminación de células a través de la citotoxicidad de la subunidad A de toxina Shiga

30 [0590] Ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son citotóxicas. Ciertas realizaciones adicionales de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son citotóxicas solo debido a la presencia de uno o más componentes del polipéptido efector de toxina Shiga. Las Subunidades A de los miembros de la familia de toxinas Shiga comprenden cada una una región de polipéptidos enzimáticamente activos capaces de matar una célula eucariota una vez en el citosol de la célula. Debido a que los miembros de la familia de toxinas Shiga están adaptados para matar células eucariotas, las moléculas derivadas de toxinas Shiga, tales como, por ejemplo, moléculas que comprenden ciertas realizaciones de los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención pueden exhibir potentes actividades de destrucción celular.

40 [0591] Para ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, al contactar una célula físicamente acoplada con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular (por ejemplo, una célula positiva diana), el objetivo de la célula La molécula es capaz de causar la muerte de la célula. Para ciertas realizaciones adicionales, el valor de  $CD_{50}$  de la molécula de reconocimiento celular es inferior a 5, 2.5, 1, 0.5 o 0.25 nM, que es mucho más potente que un polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje no dirigido (por ejemplo, SEQ ID NO: 4).

45 [0592] La eliminación celular se puede realizar usando una molécula de la presente invención en condiciones variadas de las células diana, tal como, por ejemplo, un ex vivo manipulada célula diana, una célula diana se cultivan in vitro, una célula diana dentro de una muestra de tejido cultivado in vitro, o una célula diana en un entorno in vivo como dentro de un organismo multicelular.

50 [0593] En ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención comprenden (1) una subregión efectora de la toxina Shiga desinmunizada, (2) una región resistente a la escisión de la proteasa cerca del carboxi. terminal de una región derivada del fragmento de toxina Shiga A1, (3) un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal; y/o (4) una región embebida o insertada en el epítipo de células T heterólogas; sin embargo, para ciertas realizaciones adicionales, estas modificaciones estructurales no alteran significativamente la potencia de la citotoxicidad de la toxina Shiga en comparación con las moléculas de referencia que comprenden un polipéptido de la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, como, por ejemplo, un fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje. Por lo tanto, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención que están desinmunizadas, son resistentes a la escisión de proteasas y/o portan epítopos heterólogos integrados o insertados pueden mantener una citotoxicidad potente mientras proporcionan una o más de otras funcionalidades o propiedades.

65 [0594] Las moléculas que apuntan a las células citotóxicas que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga pueden ser manipuladas por el técnico experto utilizando la información y los procedimientos proporcionados en este documento para ser más citotóxicos y/o tener citotoxicidades de respaldo redundantes que operan a través de mecanismos completamente diferentes. Estos múltiples mecanismos citotóxicos pueden complementarse entre sí

por su diversidad de funciones (como proporcionar una potente eliminación mediante dos mecanismos de eliminación de células, directos e indirectos, así como mecanismos de inmunoestimulación en el área local), que se respaldan mutuamente (por ejemplo, proporcionando un mecanismo de destrucción celular en ausencia de otros mecanismos, como si una célula diana es resistente o adquiere inmunidad a un subconjunto de mecanismos previamente activos), y/o protege contra la resistencia desarrollada (al limitar la resistencia a la situación menos probable de que la célula maligna o infectada bloquee múltiples y diferentes mecanismos de destrucción celular simultáneamente).

#### E. Suministro de un epítipo de células T para la presentación de MHC Clase I en una superficie celular

[0595] En ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas que se dirigen a las células de la presente invención comprenden un epítipo de células T, que permite la ingeniería de moléculas de "liberación de epítipos de células T" con opciones virtualmente ilimitadas de cargas epítipo-péptido para administración y presentación en la superficie celular por una célula nucleada y cordada. Para ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son capaces de suministrar uno o más epítipos de células T, asociados con los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y/o las moléculas de reconocimiento celular, al proteasoma de una célula. El epítipo de células T administradas se procesa proteolíticamente y se presenta mediante la ruta MHC de clase I en la superficie de la célula. Mediante la ingeniería de epítipos de MHC de clase I en moléculas que se dirigen a las células, la administración dirigida y la presentación de antígenos inmunoestimuladores se pueden lograr para aprovechar y dirigir una función o funciones beneficiosas de un sistema inmunitario cordal.

[0596] Para ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga o la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de administrar un epítipo de células T a una molécula MHC de clase I de una célula para la presentación en la superficie celular. En ciertas realizaciones, el polipéptido efector de la toxina Shiga o la molécula de reconocimiento celular de la presente invención comprende un epítipo heterólogo de células T, ya sea como material exógeno adicional o integrado o insertado dentro de un polipéptido efector de la toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, el polipéptido efector de la toxina Shiga o la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de administrar un epítipo de células T integrado o insertado a una molécula MHC de clase I para la presentación en la superficie celular.

[0597] Para ciertas realizaciones, el polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención es capaz de suministrar un epítipo de células T, que está integrado o insertado en el polipéptido efector de toxina Shiga, a una molécula MHC de clase I de una célula en la que el polipéptido efector de la toxina Shiga está presente para la presentación del epítipo de células T por la molécula MHC de clase I en una superficie de la célula. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo de células T es un epítipo de células T heterólogo. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo de células T funciona como epítipo de células T CD8 +, ya sea conocido o identificado en el futuro usando procedimientos que actualmente son rutinarios para el experto.

[0598] Para ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de administrar un epítipo de células T, que está asociado con la molécula de reconocimiento celular, a una molécula MHC de clase I de una célula para la presentación de la T-epítipo celular por la molécula MHC clase I en una superficie de la célula. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo de células T es un epítipo heterólogo de células T que está integrado o insertado en el polipéptido efector de toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo de células T funciona como epítipo de células T CD8 +, ya sea conocido o identificado en el futuro usando procedimientos que actualmente son rutinarios para el experto.

[0599] Para ciertas realizaciones, al poner en contacto una célula con la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, la molécula de reconocimiento celular es capaz de suministrar un péptido-epítipo de célula T, que está asociado con la molécula de reconocimiento celular, a una molécula MHC de clase I de la célula para la presentación del epítipo-péptido de células T por la molécula MHC de clase I en una superficie de la célula. Para ciertas realizaciones adicionales, el péptido-epítipo de células T es un epítipo heterólogo que está integrado o insertado en un polipéptido efector de toxina Shiga. Para ciertas realizaciones adicionales, el epítipo-péptido de células T funciona como epítipo de células T CD8 +, ya sea conocido o identificado en el futuro usando procedimientos que actualmente son rutinarios para el experto.

[0600] La adición de un epítipo heterólogo o la presencia de un epítipo heterólogo en una molécula de reconocimiento celular de la presente invención, ya sea como material exógeno adicional o integrado o insertado dentro de un polipéptido efector de toxina Shiga, permite procedimientos para usar dicha célula moléculas dirigidas para el suministro dirigido a la célula de un epítipo elegido para la presentación de la superficie celular por una célula diana nucleada dentro de un cordado.

[0601] Una función de ciertos polipéptidos efectores de toxina Shiga hiperinmunizados de células T CD8 + y moléculas de reconocimiento celular de la presente invención es la administración de uno o más péptidos-epítipos de células T a una molécula MHC de clase I para MHC presentación de clase I por una célula. La administración de

péptidos-epítomos de células T exógenos al sistema MHC de clase I de una célula diana puede usarse para inducir a la célula diana a presentar el péptido-epítomo de células T en asociación con moléculas de MHC de clase I en la superficie celular, que posteriormente conduce a la activación de las células T efectoras CD8 + para atacar la célula diana.

5 [0602] El experto, utilizando técnicas conocidas en la técnica, puede asociar, acoplar y/o vincular ciertos polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención a varias otras regiones de unión dirigidas a células para crear moléculas de reconocimiento celular del presente invención que apunta a biomoléculas específicas, extracelulares, diana físicamente acopladas a las células y promueve la internalización de estas células que se dirigen a las células diana. Se cree que todas las células vertebradas nucleadas son capaces de presentar epítomos intracelulares utilizando el sistema MHC de clase I. Por lo tanto, las biomoléculas diana extracelulares de las moléculas que se dirigen a las células de la invención pueden en principio dirigirse a cualquier célula vertebrada nucleada para el suministro de epítomos de células T a una ruta de presentación de MHC de clase I de dicha célula.

15 [0603] Las funciones de liberación de epítomos de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden detectarse y controlarse mediante una variedad de procedimientos estándar conocidos en la técnica para el experto en la materia y/o descritos aquí. Por ejemplo, la capacidad de las moléculas que se dirigen a las células de la presente invención para administrar un epítomo-péptido de células T e impulsar la presentación del epítomo-péptido por el sistema MHC de clase I de células diana puede investigarse usando diversos in vitro e in vivo ensayos, que incluyen, por ejemplo, la detección/visualización directa de complejos MHC clase I/péptido, medición de afinidades de unión para el epítomo-péptido de células T heterólogo a moléculas MHC clase I, y/o medición de consecuencias funcionales de MHC clase I presentación del complejo peptídico en células diana mediante el seguimiento de las respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) (véanse, por ejemplo, los ejemplos a continuación).

25 [0604] Ciertos ensayos para controlar esta función de los polipéptidos y moléculas de la presente invención implican la detección directa de un complejo de antígeno peptídico/péptido MHC de clase I in vitro o ex vivo. Los procedimientos comunes para la visualización directa y la cuantificación de complejos de péptido-MHC de clase I implican varios reactivos de inmunodetección conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden desarrollar anticuerpos monoclonales específicos para reconocer un complejo MHC/clase I/péptido antígeno particular. De manera similar, los receptores de células T multiméricos solubles, como los reactivos TCR-STAR (Altor Bioscience Corp., Miramar, FL, EE. UU.) Se pueden usar para visualizar o cuantificar directamente complejos específicos de MHC I/antígeno (Zhu X et al., J Immunol 176: 3223-32 (2006)). Estos mAbs específicos o receptores de células T multiméricos solubles pueden usarse con varios procedimientos de detección, que incluyen, por ejemplo, inmunohistoquímica, citometría de flujo y inmunoensayo enzimático (ELISA).

35 [0605] Un procedimiento alternativo para la identificación y cuantificación directa de complejos de MHC I/péptido implica análisis de espectrometría de masas, tales como, por ejemplo, el Ensayo de presentación de antígeno ProPresent (ProImmune, Inc., Sarasota, FL, EE. UU.) En qué clase de péptido-MCH Los complejos I se extraen de las superficies de las células, a continuación los péptidos se purifican e identifican mediante secuenciación por espectrometría de masas (Falk K et al., Nature 351: 290-6 (1991)).

45 [0606] En ciertos ensayos para controlar el suministro de epítomos de células T y la función de presentación de MHC de clase I de los polipéptidos y moléculas de la presente invención implican procedimientos computacionales y/o experimentales para controlar el MHC de clase I y la unión y estabilidad de péptidos. Hay varios programas de software disponibles para que los trabajadores calificados los usen para predecir las respuestas de unión de los péptidos a los alelos de la clase I del MHC, como, por ejemplo, la Herramienta de consenso de predicción de la unión de la base de datos y análisis de recursos del análisis inmunitario (IEDB). Y et al., Nucleic Acid Res 40: W525-30 (2012). Se han aplicado de manera rutinaria varios ensayos experimentales, tales como, por ejemplo, ensayos de unión a la superficie celular y/o ensayos de resonancia de plasmones superficiales para cuantificar y/o comparar la cinética de unión (Miles K et al., Mol Immunol 48: 728-32 (2011)). Además, otros ensayos de unión de péptido MHC basados en una medida de la capacidad de un péptido para estabilizar el complejo ternario MHC-péptido para un MHC de clase I dado se han desarrollado alelos, como comparación con controles conocidos (por ejemplo, ensayo de unión a péptido MHC de ProImmune, Inc.).

55 [0607] Alternativamente, las mediciones de la consecuencia de la presentación del complejo de antígeno peptídico/clase MHC en la superficie celular pueden realizarse monitorizando la respuesta de células T citotóxicas (CTL) al complejo específico. Estas mediciones incluyen el etiquetado directo de los CTL con reactivos tetrameros o pentámeros MHC de clase I. Los tetrameros o pentámeros se unen directamente a los receptores de células T de una especificidad particular, determinada por el complejo alelo y péptido del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Además, la cuantificación de las citocinas liberadas, como el interferón gamma o las interleucinas por ELISA o inmunospot ligado a enzimas (ELISpot) se analiza comúnmente para identificar respuestas específicas de CTL. La capacidad citotóxica de CTL se puede medir utilizando varios ensayos, incluido el ensayo clásico de liberación de 51 Cromo (Cr) o ensayos alternativos de citotoxicidad no radioactiva (por ejemplo, kits no radiactivos CytoTox96® y kits CellTox™ CellTiter-GLO® disponibles en Promega Corp., Madison, WI, EE. UU., Granzyme B ELISpot, Ensayos de

actividad de caspasa o ensayos de citometría de flujo de translocación LAMP-1. Para monitorear específicamente la destrucción de las células diana, el succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) se puede usar para marcar fácil y rápidamente una población celular de interés para la investigación in vitro o in vivo para monitorear la destrucción de las células diana marcadas con CFSE específicas del epítipo (Durward M et al., J Vis Exp 45 pii 2250 (2010)).

[0608] Las respuestas in vivo a la presentación de MHC de clase I pueden seguirse administrando un agente promotor de MHC de clase I/antígeno (por ejemplo, un péptido, proteína o vacuna de virus inactivado/atenuado) seguido de un desafío con un agente activo (por ejemplo, un virus) y monitorear las respuestas a ese agente, típicamente en comparación con los controles no vacunados. Las muestras ex vivo pueden monitorizarse para determinar la actividad de CTL con procedimientos similares a los descritos anteriormente (por ejemplo, ensayos de citotoxicidad de CTL y cuantificación de la liberación de citocinas).

[0609] Las moléculas de HLA-A, HLA-B y/o HLA-C se aíslan de las células intoxicadas después de la lisis usando afinidad inmunitaria (por ejemplo, una purificación "pulldown" de anticuerpos anti-MHC) y los péptidos asociados (es decir, el péptidos presentados por las moléculas de MHC aisladas) se recuperan de los complejos purificados. Los péptidos recuperados se analizan mediante secuenciación por espectrometría de masas. Los datos de espectrometría de masas se comparan con una biblioteca de base de datos de proteínas que consiste en la secuencia del péptido exógeno (no propio) (epítipo de células T X) y el índice internacional de proteínas para humanos (que representa péptidos "propios" o no inmunogénicos). Los péptidos se clasifican según su importancia de acuerdo con una base de datos de probabilidad. Se enumeran todas las secuencias de péptidos antigénicos (no propios) detectados. Los datos se verifican buscando en una base de datos codificada para reducir los falsos resultados (ver, por ejemplo, Ma B, Johnson R, Mol Cell Proteomics 11: O111.014902 (2012)) .Los resultados demostrarán que los péptidos del epítipo X de células T se presentan en complejos de MHC en la superficie de las células diana intoxicadas.

[0610] El conjunto de complejos de péptido-antígeno-MHC presentados puede variar entre las células debido a las moléculas de HLA específicas de antígeno expresadas. Las células T pueden reconocer complejos específicos de péptido-antígeno-MHC que se muestran en una superficie celular usando diferentes moléculas de TCR con diferentes especificidades de antígeno.

[0611] Debido a que los epítopos de células T múltiples pueden ser administrados por una molécula de reconocimiento celular de la invención, tal como, por ejemplo, incrustando dos o más epítopos de células T diferentes en un único polipéptido efector liberador de proteasoma, un solo objetivo dirigido a las células La molécula de la invención puede ser cordados efectivos de la misma especie con diferentes variantes de clase MHC, tales como, por ejemplo, en humanos con diferentes alelos HLA. Esto puede permitir la combinación dentro de una sola molécula de diferentes epítopos de células T con diferente efectividad en diferentes subpoblaciones de sujetos basadas en la diversidad de proteínas complejas de MHC y polimorfismos. Por ejemplo, las proteínas del complejo MHC humano, las proteínas HLA, varían entre los humanos según su ascendencia genética, por ejemplo, africanos (subsaharianos), amerindios, caucásicos, mongoloides, nueva guineanos y australianos o isleños del Pacífico.

[0612] Las aplicaciones que implican el epítipo de células T que suministran polipéptidos y moléculas de la presente invención son vastas. Cada célula nucleada en un organismo de mamíferos puede ser capaz de presentar la ruta de MHC de clase I de péptidos-epítopos de células T inmunogénicos en sus superficies externas celulares complejadas con moléculas de MHC de clase I. Además, la sensibilidad del reconocimiento de epítopos de células T es tan exquisita que solo se requieren unos pocos complejos de péptidos MHC-I para dar como resultado una respuesta inmune, por ejemplo, incluso la presentación de un solo complejo puede ser suficiente para el reconocimiento por parte de un célula T efectora (Sykulev Y et al., Immunity 4: 565-71 (1996)).

[0613] La activación de las respuestas de células T son características deseadas de ciertos fármacos biológicos anticancerígenos, antineoplásicos, antitumorales y/o antimicrobianos para estimular el propio sistema inmunitario del paciente hacia las células diana. La activación de una respuesta robusta y fuerte de células T también es una característica deseada de muchas vacunas. La presentación de un epítipo de células T por una célula diana dentro de un organismo puede conducir a la activación de respuestas inmunes robustas a una célula diana y/o su localización general dentro de un organismo. Por lo tanto, el suministro dirigido de un epítipo de células T para presentación puede utilizarse como un mecanismo para activar las respuestas de células T durante un régimen terapéutico.

[0614] La presentación de un epítipo-péptido inmunogénico de células T por el sistema MHC de clase I se dirige a la célula presentadora para matar por lisis mediada por CTL y también desencadena la estimulación inmune en el microambiente local. Mediante la ingeniería de secuencias de epítopos inmunogénicos dentro de los componentes del polipéptido efector de la toxina Shiga de las moléculas terapéuticas internalizadoras de células diana, se puede lograr el suministro dirigido y la presentación de antígenos inmunoestimuladores. La presentación de antígenos inmunoestimulantes no propios, tales como, por ejemplo, antígenos virales conocidos con alta inmunogenicidad, por medio de señales de células diana a otras células inmunes para destruir las células diana, así como para reclutar

más células inmunes en el área.

[0615] La presentación de un péptido-epítipo de células T inmunogénicas por el complejo MHC de clase I se dirige a la célula presentadora para matar por citólisis mediada por CTL. La presentación por parte de las células diana de antígenos inmunostimulantes no propios, tales como, por ejemplo, péptidos epítipos virales conocidos con alta inmunogenicidad, puede indicar a otras células inmunes que destruyan las células diana y recluten más células inmunes al sitio de la célula diana dentro un cordado

[0616] Por lo tanto, moléculas ya citotóxicas, tales como, por ejemplo, moléculas terapéuticas o potencialmente terapéuticas que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga, pueden manipularse usando procedimientos de la presente invención en más moléculas citotóxicas y/o tener un mecanismo citotóxico adicional que funcione mediante la administración de un Epítipo de células T, presentación y estimulación de células T efectoras. Estos múltiples mecanismos citotóxicos pueden complementarse entre sí (por ejemplo, al proporcionar tanto la muerte directa de células diana como la muerte celular indirecta (mediada por CTL), se respaldan mutuamente de forma redundante (como al proporcionar un mecanismo de muerte celular en ausencia de el otro), y/o proteger contra el desarrollo de resistencia terapéutica (limitando la resistencia a la situación menos probable de la célula maligna o infectada que evoluciona para bloquear dos mecanismos diferentes de destrucción celular simultáneamente).

[0617] Además, una molécula citotóxica que comprende una región de polipéptido efector de toxina Shiga que exhibe citotoxicidad basada en catalizadores puede ser diseñada por un experto utilizando procedimientos de rutina en variantes enzimáticamente inactivas. Por ejemplo, el componente del polipéptido efector de la toxina Shiga citotóxica de una molécula citotóxica puede conferirse con una actividad reducida y/o quedar inactivo por la introducción de una o mutaciones y/o truncamientos de modo que la molécula resultante todavía puede ser citotóxica a través de su capacidad para liberar un epítipo de células T al sistema MHC de clase I de una célula diana y posterior presentación en la superficie de la célula diana. En otro ejemplo, un epítipo de células T puede insertarse o incrustarse en un polipéptido efector de toxina Shiga de modo que el polipéptido efector de toxina Shiga sea inactivado por el epítipo agregado (véase, por ejemplo, WO 2015/113007). Este enfoque elimina un mecanismo citotóxico mientras retiene o agrega otro y también puede proporcionar una molécula capaz de exhibir inmunostimulación en el área local de una célula o células diana dentro de un organismo a través de la presentación del epítipo de células T administradas o "siembra de antígeno". Además, las variantes no citotóxicas de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención que comprenden epítipos de células T heterólogas embebidas o insertadas pueden ser útiles en aplicaciones que implican la inmunostimulación dentro de un cordado y/o el marcado de células diana dentro de un cordado con MHC clase I, la molécula muestra epítipos.

[0618] La capacidad de administrar un epítipo de células T de ciertos polipéptidos efectores de toxina Shiga y moléculas de reconocimiento celular de la presente invención puede lograrse en condiciones variadas y en presencia de células espectadoras no dirigidas, tales como, por ejemplo, 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 en un entorno in vivo como dentro de un organismo multicelular.

#### F. Eliminación de células mediante citotoxicidad dirigida y/o acoplamiento de células T citotóxicas

[0619] Para ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención puede proporcionar 1) suministro de un epítipo de células T para la presentación de MHC de clase I por una célula diana y/o 2) citotoxicidad potente. Para ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, al ponerse en contacto con una célula físicamente acoplada con una biomolécula de objetivo extracelular de la región de unión de reconocimiento celular, la molécula de reconocimiento celular de la invención es capaz de causar la muerte de la célula. El mecanismo de destrucción celular puede ser directo, por ejemplo, a través de la actividad enzimática de una región polipeptídica efectora de toxina, o indirecta a través de la citólisis mediada por CTL.

##### 1. Eliminación indirecta de células mediante el suministro de epítipos de células T y la presentación de MHC Clase I

[0620] Ciertas realizaciones de las moléculas que se dirigen a las células de la presente invención son citotóxicas porque comprenden un epítipo de células T CD8 + capaz de ser administrándose a la ruta de presentación MHC de clase I de una célula diana y presentado en una superficie celular del objetivo célula. Por ejemplo, la administración de epítipos de células T, los polipéptidos efectores de toxina Shiga hiperinmunizados de células T CD8 + de la presente invención, con o sin desinmunización de epítipos endógenos, se pueden usar como componentes de moléculas de reconocimiento celular para aplicaciones que involucran la eliminación indirecta de células.

[0621] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, al contactar una célula físicamente acoplada con una biomolécula objetivo extracelular de la región de unión de reconocimiento celular, la molécula de reconocimiento celular de la invención es capaz de causar indirectamente muerte de la célula, tal como, por ejemplo, mediante la presentación de uno o más epítipos de células T por la célula diana y el posterior reclutamiento de CTL que matan la célula diana.

[0622] La presentación de un péptido antigénico complejado con una molécula de MHC de clase I por una célula sensibiliza a la célula presentadora a la destrucción dirigida por las células T citotóxicas (CTL) mediante la inducción de apoptosis, lisis y/o necrosis. Además, los CTL que reconocen la célula diana pueden liberar citocinas inmunoestimuladoras, como, por ejemplo, interferón gamma (IFN-gamma), factor de necrosis tumoral alfa (TNF), proteína inflamatoria macrófaga beta 1 (MIP-1beta), e interleucinas tales como IL-17, IL-4 e IL-22. Además, los CTL activados por el reconocimiento de un epítipo presentado pueden matar indiscriminadamente otras células proximales a la célula presentadora, independientemente del repertorio complejo de péptido-MHC de clase I presentado por esas células proximales (Wiedemann A et al., Proc Natl Acad Sci USA 103: 10985 -90 (2006)).

[0623] Debido a la diversidad de alelos de MHC dentro de diferentes especies, una molécula de reconocimiento celular de la presente invención que comprende solo un único epítipo puede exhibir una eficacia variada a diferentes pacientes o sujetos de la misma especie. Sin embargo, ciertas realizaciones de las moléculas que se dirigen a las células de la presente invención pueden comprender cada una múltiples epítipos de células T que pueden administrarse al sistema MHC de clase I de una célula diana simultáneamente. Por lo tanto, para ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, se usa una molécula de reconocimiento celular para tratar diferentes sujetos con diferencias considerables en las afinidades de unión del epítipo-péptido de sus moléculas MHC (es decir, diferencias considerables en sus alelos MHC y/o genotipos MHC). Además, ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención reducen o evitan las adaptaciones de las células diana para escapar de la muerte (por ejemplo, una célula cancerosa objetivo que muta para escapar de la eficacia terapéutica o "escape mutante") mediante el uso de múltiples mecanismos de eliminación de células simultáneamente (p. ej., matanza directa y matanza indirecta mediante múltiples epítipos diferentes de células T simultáneamente).

## 2. Eliminación directa de células mediante citotoxicidad de toxina Shiga dirigida a células

[0624] Ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son citotóxicas porque comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga catalíticamente activo e independientemente de la presencia de un epítipo inmunogénico de células T CD8 + en la molécula. Por ejemplo, los polipéptidos efectores de toxina Shiga hiperinmunizados de células T CD8 + de la presente invención, con o sin desinmunización de epítipos endógenos, pueden usarse como componentes de moléculas de reconocimiento celular para aplicaciones que implican la destrucción directa de células, tales como, por ejemplo, a través de la actividad enzimática ribotóxica de un polipéptido efector de la toxina Shiga o la unión del ribosoma e interferencia con la función del ribosoma debido a un mecanismo o mecanismos no catalíticos.

[0625] Para ciertas realizaciones de las moléculas CD8 + de células T hiperinmunizadas, de reconocimiento celular de la presente invención, al contactar una célula físicamente acoplada con una biomolécula diana extracelular de la región de unión a la célula, la molécula de célula la invención es capaz de causar directamente la muerte de la célula, tal como, por ejemplo, sin la participación de una célula T citotóxica no dirigida (véase la Sección VD, supra).

## G. Citotoxicidad selectiva entre tipos de células

[0626] Ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención tienen usos en la destrucción selectiva de células diana específicas en presencia de células espectadoras no dirigidas. Al dirigir la administración de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención a células específicas a través de una región o regiones de unión a las células, las moléculas de células de la presente invención pueden exhibir actividades específicas de destrucción celular restringidas específicas del tipo de célula que resultan en la eliminación exclusiva o preferencial de tipos de células seleccionadas en presencia de células no dirigidas. De manera similar, al dirigir el suministro de epítipos de células T inmunogénicas a la ruta MHC de clase I de las células diana, se puede presentar posteriormente los epítipos de células T y la citólisis mediada por CTL de las células diana inducidas por las moléculas de células diana de la invención restringido a matar de forma exclusiva o preferencial tipos de células seleccionados en presencia de células no dirigidas. Además, tanto la administración de reconocimiento celular de una región citotóxica del polipéptido efector de la toxina Shiga como un epítipo inmunogénico de células T se puede lograr mediante una sola molécula de reconocimiento celular de la presente invención, de modo que el suministro de ambos componentes potencialmente citotóxicos está restringido exclusiva o preferentemente a las células diana en presencia de células no dirigidas.

[0627] Para ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención es citotóxica a ciertas concentraciones. En ciertas realizaciones, tras la administración de la molécula de reconocimiento celular de la presente invención a una mezcla de tipos de células, la molécula citotóxica de reconocimiento celular es capaz de matar selectivamente aquellas células que están físicamente acopladas con una biomolécula diana extracelular en comparación con los tipos de células no acoplado físicamente con una biomolécula diana extracelular. Para ciertas realizaciones, la molécula citotóxica de reconocimiento celular de la presente invención es capaz de causar selectiva o preferentemente la muerte de un tipo de célula específico dentro de una mezcla de dos o más tipos de células diferentes. Esto permite dirigir la actividad citotóxica a tipos de células específicos con una alta preferencia, como un efecto citotóxico triple, sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan la biomolécula

objetivo. 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 objetivo. Esto permite la eliminación selectiva de células de tipos de células específicos con una alta preferencia, como un efecto citotóxico triple, sobre los tipos de células "espectadoras" que no expresan cantidades significativas de la biomolécula objetivo o que no están físicamente acopladas a cantidades significativas de La biomolécula objetivo.

[0628] Para ciertas realizaciones adicionales, tras la administración de la molécula citotóxica de reconocimiento celular a dos poblaciones diferentes de tipos de células, la molécula citotóxica de reconocimiento celular 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 molécula citotóxica de reconocimiento celular, a una dosis al menos tres veces menor que la dosis  $CD_{50}$  de la misma molécula citotóxica de reconocimiento celular a una población de células cuyos miembros no expresan una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula citotóxica de reconocimiento celular.

[0629] Para ciertas realizaciones, la actividad citotóxica de una molécula de reconocimiento celular 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 junto con cualquier biomolécula diana extracelular de la región de unión. 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 a (b) citotoxicidad hacia una población de células de un tipo de célula no físicamente acoplado con una biomolécula diana de la región de unión. 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 o 1000 veces más para poblaciones de células o tipos de células físicamente acopladas con una biomolécula diana de la región de unión en comparación con las poblaciones de células o tipos de células no acopladas físicamente con una biomolécula diana de la región de unión.

[0630] Para ciertas realizaciones, la función de destrucción celular preferencial o la citotoxicidad selectiva de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención se debe a un material exógeno adicional (por ejemplo, un material citotóxico) y/o epítipo heterólogo de células T presente en un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención y no necesariamente un resultado de la actividad catalítica de una región de polipéptido efector de toxina Shiga.

[0631] Esta función de eliminación de células preferencial permite que una célula diana sea eliminada por ciertas moléculas citotóxicas, dirigidas a células de la presente invención en condiciones variadas y en presencia de células espectadoras no dirigidas, tales como mezclas de células manipuladas ex vivo tipos, 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).

#### H. Suministro de material exógeno adicional al interior de las células dirigidas

[0632] Además de las aplicaciones de estimulación citotóxica, citostática e inmune, las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden usarse opcionalmente para funciones de administración intracelular dirigidas, tales como, por ejemplo, en aplicaciones que implican la recopilación de información y funciones de diagnóstico.

[0633] Debido a que las moléculas de reconocimiento celular de la invención, incluida la citotoxicidad reducida y/o las formas no tóxicas de las mismas, son capaces de entrar en las células físicamente acopladas con una biomolécula diana extracelular reconocida por la región de unión de la molécula de reconocimiento celular, ciertas realizaciones de la célula Las moléculas direccionadoras de la invención pueden usarse para suministrar materiales exógenos adicionales al interior de los tipos de células diana. Por ejemplo, las variantes no tóxicas de las moléculas citotóxicas, de reconocimiento celular de la invención, u opcionalmente variantes citotóxicas, se pueden usar para suministrar materiales exógenos adicionales y/o etiquetar el interior de las células físicamente acopladas con una biomolécula diana extracelular de la región de unión de la molécula de reconocimiento celular. Las moléculas que se dirigen a las células de la invención pueden recibir diversos tipos de células y/o poblaciones de células que expresan biomoléculas diana en al menos una superficie celular para recibir materiales exógenos. Los componentes funcionales de la presente invención son modulares, en el sentido de que diversos polipéptidos efectores de toxinas Shiga, materiales exógenos adicionales y regiones de unión pueden asociarse entre sí para proporcionar moléculas de reconocimiento celular adecuadas para diversas aplicaciones que implican la administración de carga, tales como, por ejemplo, Imagen no invasiva in vivo de células tumorales.

[0634] Esta administración de la función material exógena de ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención se puede lograr en condiciones variadas y en presencia de células espectadoras no dirigidas, tales como, por ejemplo, una célula diana manipulada ex vivo, un objetivo célula cultivada in vitro, una célula diana



dentro de una muestra de tejido cultivada in vitro, o una célula diana en un entorno in vivo como dentro de un organismo multicelular. Además, el suministro selectivo de material exógeno a ciertas células por ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención se puede lograr en condiciones variadas y en presencia de células espectadoras no dirigidas, tales como mezclas manipuladas ex vivo de tipos de células, in vitro tejidos cultivados 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).

[0635] Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular que no son capaces, como ciertos rangos de concentración, de matar una célula diana y/o administrar un epítipo integrado o insertado para la presentación de la superficie celular por una molécula MHC de un objetivo La célula aún puede ser útil para suministrar materiales exógenos a las células, tales como, por ejemplo, agentes promotores de detección.

[0636] Para ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención exhiben citotoxicidad baja a cero y, por lo tanto, se denominan en el presente documento "citotóxicos no citotóxicos y/o reducidos". Para ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención exhibe una citotoxicidad baja a cero y puede denominarse "variantes citotóxicas no citotóxicas" y/o "variantes citotóxicas reducidas". Por ejemplo, ciertas realizaciones de las moléculas de la presente invención no exhiben un nivel significativo de citotoxicidad basada en la toxina Shiga en donde a dosis de menos de 1000 nM, 500nM, 100 nM, 75 nM, 50 nM, no hay una cantidad significativa de células muerte en comparación con la molécula de referencia apropiada, tal como, por ejemplo, medida por un ensayo conocido por el experto en la materia y/o descrito aquí. Para ciertas realizaciones adicionales, las moléculas de la presente invención no exhiben ninguna toxicidad a dosis de 1-100 µg por kg de un receptor mamífero. Las variantes citotóxicas reducidas aún pueden ser citotóxicas a ciertas concentraciones o dosis, pero exhiben citotoxicidad reducida, tal como, por ejemplo, no son capaces de exhibir un nivel significativo de citotoxicidad de toxina Shiga en ciertas situaciones.

[0637] Los polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención, y ciertas moléculas de reconocimiento celular que comprenden las mismas, pueden volverse no citotóxicas, tales como, por ejemplo, mediante la adición de una o más sustituciones de aminoácidos conocidas por el experto inactiva una subunidad A de toxina Shiga y/o un polipéptido efector de toxina Shiga, incluidas las sustituciones de ejemplo descritas en este documento. Las variantes citotóxicas reducidas y no citotóxicas de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden ser, en ciertas situaciones, más adecuadas para el suministro de materiales exógenos adicionales que más variantes citotóxicas.

#### Recopilación de información para funciones de diagnóstico

[0638] En ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención tienen usos en la detección in vitro y/o in vivo de células específicas, tipos de células y/o poblaciones celulares, así como compartimentos subcelulares específicos de cualquiera de los mencionados anteriormente. La citotoxicidad reducida y/o las formas no tóxicas de las moléculas citotóxicas de reconocimiento celular de la invención 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 el mismo o una región de unión relacionada, tal como, por ejemplo, una región de unión con unión de alta afinidad a la misma biomolécula diana, un epítipo superpuesto y/o el mismo epítipo.

[0639] En ciertas realizaciones, las moléculas de reconocimiento celular descritas en el presente documento se usan tanto para diagnóstico como para tratamiento, o solo para diagnóstico. Cuando se usa la misma molécula citotóxica de reconocimiento celular para el diagnóstico y el tratamiento, para ciertas realizaciones de la presente invención, la variante de la molécula de reconocimiento celular que incorpora un agente promotor de la detección para el diagnóstico puede reducir su citotoxicidad o puede volverse no tóxica por inactivación catalítica de su (s) región (es) de polipéptido efector de toxina Shiga a través de una o más sustituciones de aminoácidos, incluidas las sustituciones de ejemplo descritas en este documento. Por ejemplo, ciertas variantes no tóxicas de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención exhiben menos del 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de muerte de las células diana después de la administración de una dosis inferior a 1 mg/kg. Las variantes de citotoxicidad reducida aún pueden ser citotóxicas a ciertas concentraciones o dosis, pero exhiben citotoxicidad reducida, tal como, por ejemplo, no son capaces de exhibir un nivel significativo de citotoxicidad de toxina Shiga como se describe aquí.

[0640] La capacidad de conjugar agentes promotores de detección conocidos en la técnica con diversas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención proporciona composiciones útiles para la detección de ciertas células, tales como, por ejemplo, células cancerosas, tumorales, inmunes y/o infectadas. Estas realizaciones de diagnóstico de las moléculas de reconocimiento celular 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 moléculas que se dirigen a las células de la invención se pueden usar para recopilar información a través de imágenes de orgánulos intracelulares (por ejemplo, endocitóticos, Golgi, retículo endoplásmico y compartimientos citosólicos) de células cancerosas individuales, células inmunes y/o infectadas células en una muestra de paciente o biopsia.

[0641] Varios tipos de información pueden ser recogidos utilizando las realizaciones de diagnóstico de las moléculas de reconocimiento celular 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, evaluar la progresión de las terapias inmunomoduladoras a lo largo del tiempo, evaluar la progresión de las terapias antimicrobianas durante tiempo, evaluando la presencia de células infectadas en materiales de trasplante, evaluando la presencia de tipos de células no deseadas en materiales de trasplante, y/o evaluando la presencia de células tumorales residuales después de la escisión quirúrgica de una masa tumoral.

[0642] Por ejemplo, las subpoblaciones de pacientes podrían determinarse utilizando la información recopilada utilizando las variantes de diagnóstico de las moléculas de reconocimiento celular 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 criterio utilizado para definir una subpoblación de pacientes. Por ejemplo, una variante de diagnóstico no tóxica de una molécula citotóxica particular de reconocimiento celular de la invención se puede usar para diferenciar qué pacientes están en una clase o subpoblación de pacientes predichos para responder positivamente a una variante citotóxica de esa molécula de reconocimiento celular de la molécula invención. De acuerdo con esto, los procedimientos asociados para la identificación del paciente, la estratificación del paciente y el diagnóstico utilizando moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, incluidas las variantes no tóxicas de moléculas citotóxicas dirigidas a células de la presente invención, se consideran dentro del alcance de la presente invención.

[0643] La expresión de la biomolécula diana por una célula no necesita ser nativa para que la molécula de la presente invención apunte a la célula, tal como, por ejemplo, para la muerte celular directa, la muerte celular indirecta, el suministro de materiales exógenos como los epítopos de células T y/o la recopilación de información. 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, virales adenoasociados y retrovirales. Un ejemplo de inducir 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 retinoico todo trans y varios retinoides sintéticos, o cualquier agonista del receptor del ácido retinoico (RAR) (Drach J et al., Cancer Res 54: 1746-52 (1994); Urano A et al., J Leukoc Biol 90: 235-47 (2011)). La expresión de CD30 puede inducirse tanto en células B como en células T por exposición a mitógenos, fitohemaglutinina (PHA), proteína estafilocócica A, virus EBV, virus de leucemia de células T humanas 1 o 2 (HTLV-1 o HTLV-2) (véase, por ejemplo, Stein H y et al., Blood 66: 848-58 (1985)). En otro ejemplo, la expresión de CD20, HER2 y EGFR puede inducirse exponiendo una célula a radiación ionizante (Wattenberg M et al., Br J Cancer 110: 1472-80 (2014)). Además, la expresión de PSMA se regula al alza en respuesta a la privación de andrógenos (véase, por ejemplo, Chang S et al., Cancer 88: 407-15 (2000); Meller B et al., EJNMMI Res 5: 66 (2015)).

#### VI. Producción, fabricación y purificación de polipéptidos efectores de toxina Shiga de la invención y moléculas de reconocimiento celular que los comprenden

[0644] Los polipéptidos efectores de toxina Shiga y ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden producirse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la invención pueden fabricarse mediante procedimientos sintéticos estándar, mediante el uso de sistemas de expresión recombinantes o mediante cualquier otro procedimiento adecuado. Por lo tanto, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la invención pueden sintetizarse de varias maneras, que incluyen, por ejemplo, procedimientos que comprenden: (1) sintetizar un polipéptido o componente polipeptídico de una molécula de reconocimiento celular usando una fase sólida estándar o metodología de fase líquida, ya sea por etapas o por ensamblaje de fragmentos, y aislar y purificar el producto compuesto de polipéptido final; (2) expresar un polinucleótido que codifica una proteína o componente de proteína de una molécula de reconocimiento celular de la invención en una célula huésped y recuperar el producto de expresión de la célula huésped o del cultivo de la célula huésped; o (3) expresión in vitro libre de células de un polinucleótido que codifica un polipéptido o componente polipeptídico de una molécula de reconocimiento celular de la invención, y que recupera el producto de expresión; o mediante cualquier combinación de los procedimientos de (1), (2) o (3) para obtener fragmentos del componente de proteína, uniendo posteriormente (por ejemplo, ligando) los fragmentos de péptido o polipéptido para obtener un componente polipeptídico y recuperando el componente polipeptídico.

[0645] Puede ser preferible sintetizar un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención, una molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o un componente proteico de una molécula de reconocimiento celular de la invención por medio de fase sólida o líquido. Fase de síntesis de péptidos. Los polipéptidos y las moléculas de reconocimiento celular de la presente 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 1998/011125 o, entre otros, a 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 el mismo.

[0646] Los polipéptidos efectores de toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden prepararse (producirse y purificarse) usando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica. En general, los procedimientos para preparar proteínas mediante el cultivo de células huésped transformadas o transfectadas con un vector que comprende el polinucleótido codificador y la purificación o recuperación de la proteína del cultivo celular se describen, por ejemplo, en Sambrook J et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 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 un polipéptido y/o una proteína de reconocimiento celular 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 un polipéptido efector de la toxina Shiga y/o una molécula de reconocimiento celular de la invención modificando el polinucleótido que codifica un polipéptido o una proteína de reconocimiento celular 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 citotoxicidad modificada, efectos citostáticos modificados y/o semivida sérica modificada.

[0647] Hay una amplia variedad de sistemas de expresión que pueden elegirse para producir un polipéptido o proteína de reconocimiento celular de la presente invención. Por ejemplo, los organismos hospedadores para la expresión de proteínas de la invención dirigidas a células incluyen procariotas, como *E. coli* y *B. subtilis*, células eucariotas, 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 como plantas transgénicas (como *A. thaliana* y *N. benthamiana*).

[0648] Por consiguiente, la presente invención también proporciona procedimientos para producir un polipéptido efector de toxina Shiga y/o una molécula de reconocimiento celular de la presente invención de acuerdo con los procedimientos mencionados anteriormente y usando una parte que codifica el polinucleótido o la totalidad de un polipéptido de la invención o un componente proteico de una proteína de reconocimiento celular de la invención, un vector de expresión que comprende al menos un polinucleótido de la invención capaz de codificar parte o la totalidad de un polipéptido o proteína de reconocimiento celular de la invención cuando se introduce en una célula huésped, y/o una célula huésped que comprende un polinucleótido o vector de expresión de la invención.

[0649] Cuando una proteína se expresa usando técnicas recombinantes en una célula huésped o en un sistema libre de células, es ventajoso separar (o purificar) la proteína deseada de otros componentes, como los factores de la célula huésped, para obtener preparaciones que son de alta pureza o son sustancialmente homogéneas. La purificación puede realizarse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como técnicas de centrifugación, técnicas de extracción, técnicas cromatográficas y de fraccionamiento (p. Ej., Separación por tamaño mediante filtración en gel, separación de carga por columna de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de fase inversa, cromatografía sobre sílice o resinas de intercambio catiónico tales como DEAE y similares, cromatofocalización y cromatografía de proteína A Sepharose para eliminar contaminantes) y técnicas de precipitación (p. ej. precipitación de etanol o precipitación de sulfato de amonio). Se puede usar cualquier cantidad de técnicas de purificación bioquímica para aumentar la pureza de un polipéptido y/o molécula de reconocimiento celular de la presente invención. En ciertas realizaciones, los polipéptidos y las moléculas de reconocimiento celular de la invención pueden purificarse opcionalmente en formas homo-multiméricas (por ejemplo, un complejo molecular que comprende dos o más polipéptidos o moléculas de reconocimiento celular de la invención).

[0650] En los ejemplos a continuación hay descripciones de ejemplos no limitantes de procedimientos para producir polipéptidos efectores de toxina Shiga de ejemplo y moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, así como aspectos específicos pero no limitantes de procedimientos de producción.

#### VII. Composiciones farmacéuticas y de diagnóstico que comprenden moléculas de reconocimiento celular de la presente invención

[0651] La presente invención proporciona polipéptidos de la toxina Shiga efectoras y moléculas de reconocimiento celular para su uso, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, en una composición farmacéutica, para el tratamiento o la profilaxis de afecciones, enfermedades, trastornos o síntomas descritos con más detalle a continuación (por ejemplo, cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, anomalías de crecimiento, trastornos inmunes e infecciones microbianas). La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido de toxina Shiga o una molécula de reconocimiento

celular de la presente invención, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, de acuerdo con la invención, junto con al menos un vehículo, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender formas homo-multiméricas y/o hetero-multiméricas de un polipéptido efector de toxina Shiga o una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas de la invención son útiles en procedimientos para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad, afección, trastorno o síntoma que se describe con más detalle a continuación. Se prevé que cada enfermedad, afección, trastorno o síntoma 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 su uso en al menos un procedimiento de tratamiento según la invención, como se describe con más detalle a continuación.

[0652] Tal como se usa en el presente documento, los términos "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente para referirse a cualquier organismo, comúnmente vertebrados tales como humanos y animales, que presenta síntomas, signos y/o indicaciones de al menos una enfermedad, trastorno o condición. Estos términos incluyen mamíferos como los ejemplares no limitantes de primates, animales de ganado (por ejemplo, ganado, caballos, cerdos, ovejas, cabras, etc.), animales de compañía (por ejemplo, gatos, perros, etc.) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, conejos, ratas, etc.).

[0653] Como se usa en el presente documento, "tratar", "tratar" o "tratamiento" y variantes gramaticales de los mismos se refieren a un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los términos pueden referirse a ralentizar el inicio o la tasa de desarrollo de una afección, trastorno o enfermedad, reducir o aliviar los síntomas asociados con ella, generar una regresión completa o parcial de la afección, o alguna combinación de cualquiera de los anteriores. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, reducción o alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (por ejemplo, no empeoramiento) del estado de la enfermedad, retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratar", "tratar" o "tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en relación con el tiempo de supervivencia esperado si no recibe tratamiento. Un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que necesita tratamiento puede ser un sujeto que ya padece la enfermedad o trastorno en cuestión. Los términos "tratar", "tratar" o "tratamiento" incluyen la inhibición o reducción de un aumento en la severidad de un estado o síntomas patológicos en relación con la ausencia de tratamiento, y no necesariamente implican el cese completo de la enfermedad relevante, trastorno o condición. Con respecto a los tumores y/o cánceres, el tratamiento incluye la reducción de la carga tumoral general y/o el tamaño del tumor individual.

[0654] Como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "prevenir", "prevención" y sus variantes gramaticales se refieren a un enfoque para prevenir el desarrollo o alterar la patología de una afección, enfermedad o trastorno. En consecuencia, "prevención" puede referirse a medidas profilácticas o preventivas. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, prevención o desaceleración de los síntomas, progresión o desarrollo de una enfermedad, ya sea detectable o indetectable. Un sujeto (p. Ej., Un ser humano) que necesita prevención puede ser un sujeto que aún no padece la enfermedad o trastorno en cuestión. El término "prevención" incluye ralentizar el inicio de la enfermedad en relación con la ausencia de tratamiento, y no necesariamente tiene la intención de implicar la prevención permanente de la enfermedad, trastorno o afección relevante. Por lo tanto, "prevenir" o "prevenir" una afección puede referirse en ciertos contextos a reducir el riesgo de desarrollar la afección, o prevenir o retrasar el desarrollo de síntomas asociados con la afección.

[0655] Como se usa en el presente documento, una "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad o dosis de una composición (por ejemplo, una composición terapéutica, compuesto o agente) que produce al menos un efecto terapéutico deseado en un sujeto, tal como prevenir o tratar una afección objetivo o aliviar de manera beneficiosa un síntoma asociado con la afección. La cantidad terapéuticamente efectiva más deseable es una cantidad que producirá la eficacia deseada de un tratamiento particular seleccionado por un experto en la materia para un sujeto dado que lo necesite. Esta cantidad variará dependiendo de una variedad de factores entendidos por el trabajador calificado, que incluyen pero no se limitan a las características de la composición terapéutica (incluida la actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (incluida la edad, el sexo, tipo de enfermedad, estadio de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis dada y tipo de medicamento), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables en la formulación y la vía de administración. Un experto en las artes clínicas y farmacológicas podrá determinar una cantidad terapéuticamente efectiva a través de la experimentación de rutina, es decir, controlando la respuesta de un sujeto a la administración de una composición y ajustando la dosis en consecuencia (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro A, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, EE. UU., 19a ed., 1995)).

[0656] Las composiciones de diagnóstico de la presente invención comprenden una molécula de reconocimiento celular de la presente invención y uno o más agentes de detección de la promoción. Cuando se produce o fabrica una composición de diagnóstico de la presente invención, una molécula de reconocimiento celular de la presente

invención puede estar unida directa o indirectamente a uno o más agentes promotores de detección. El experto en la materia conoce numerosas técnicas estándar para incorporar, fijar y/o conjugar diversos agentes promotores de detección a proteínas o componentes proteicos de moléculas, especialmente a inmunoglobulinas y dominios derivados de inmunoglobulinas.

5 [0657] Existen numerosos agentes promotores de detección conocidos por el experto en la materia, tales como isótopos, colorantes, agentes colorimétricos, agentes potenciadores del contraste, agentes fluorescentes, agentes bioluminiscentes y agentes magnéticos, que pueden estar operativamente unidos a los polipéptidos o la orientación celular moléculas de la invención para procedimientos de recopilación de información, tales como para aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico a 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)). Estos agentes pueden estar asociados, unidos y/o incorporados dentro del polipéptido o molécula de reconocimiento celular de la invención en cualquier posición adecuada. Por ejemplo, el enlace o la incorporación del agente promotor de detección puede ser a través de un residuo o aminoácidos de una molécula de la presente invención o mediante algún tipo de enlace conocido en la técnica, incluso 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.

20 [0658] De manera similar, existen numerosos enfoques de imagen conocidos por el experto, tales como técnicas de imagen in vivo no invasivas comúnmente utilizadas en el ámbito médico, por ejemplo: imágenes de tomografía computarizada (exploración por TC), imágenes ópticas (incluyendo fluorescentes directos). e imágenes bioluminiscentes), imágenes de resonancia magnética (MRI), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), ultrasonido y tomografía computarizada por rayos X.

25 VIII Producción o fabricación de composiciones farmacéuticas y/o diagnósticas que comprenden moléculas de reconocimiento celular de la presente invención

30 [0659] Las sales farmacéuticamente o solvatos de cualquiera de los polipéptidos de la toxina Shiga efectoras y moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son aceptables dentro del alcance de la presente invención.

35 [0660] El término "solvato" en el contexto de la presente invención se refiere a un complejo de estequiometría definida formada entre un soluto (en caso, un compuesto proteico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la invención) y un disolvente. El disolvente a este respecto puede ser, por ejemplo, agua, etanol u otra especie farmacéuticamente aceptable, típicamente de pequeñas moléculas orgánicas, tales como, pero sin limitación, ácido acético o ácido láctico. Cuando el disolvente en cuestión es agua, dicho solvato normalmente se denomina hidrato.

40 [0661] Los polipéptidos y proteínas de la presente invención, o sales de los mismos, pueden formularse como composiciones farmacéuticas preparadas para almacenamiento o administración, que típicamente comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de la presente invención, o una de sus sales, en forma farmacéutica transportista aceptable El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar. Los portadores farmacéuticamente aceptables para el uso de moléculas terapéuticas son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co. (A. Gennaro, ed., 1985). Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes fisiológicamente aceptables, es decir, compatibles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen aquellos utilizados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal o Administración parenteral (incluida la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica y transdérmica). Los 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 ser empleado en las composiciones farmacéuticas de la invención incluye agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, como el aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, como el etiloleato. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, como la 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, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración seleccionada, la proteína u otro componente farmacéutico puede recubrirse con un material destinado a proteger el compuesto de la acción del pH bajo y otras condiciones de inactivación natural a las que puede enfrentarse la proteína activa cuando se administra a un paciente por un particular ruta de administración.

65 [0662] Las formulaciones de las composiciones farmacéuticas de la invención pueden presentarse

convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. En tal 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, el paquete contiene cantidades discretas de las preparaciones, por ejemplo, tabletas, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una cápsula, cápsula o tableta, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas empaquetadas. Se puede proporcionar en forma inyectable de dosis única, por ejemplo en forma de pluma. Las composiciones pueden formularse para cualquier ruta y medio de administración adecuados. Los modos de administración subcutánea o transdérmica pueden ser particularmente adecuados para las proteínas terapéuticas descritas aquí.

[0663] 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 puede garantizarse 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 producirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

[0664] Una composición farmacéutica de la presente invención también incluye opcionalmente un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables 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, propilgallato, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

[0665] En otro aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o una combinación de diferentes polipéptidos y/o moléculas de reconocimiento celular de la invención, o un éster, sal o amida de cualquiera de los anteriores, y al menos uno farmacéuticamente transportista aceptable

[0666] 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 contenga, por ejemplo, agua, alcohol tal como etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), o cualquier mezcla adecuada. La fluidez adecuada se puede mantener, 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 tensioactivos de acuerdo con la química de formulación bien conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, pueden ser deseables en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares y polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0667] Las soluciones o suspensiones usadas para aplicación intradérmica o subcutánea típicamente incluyen uno o más de: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes 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 puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, o tampones con citrato, fosfato, acetato y similares. Dichas preparaciones pueden incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

[0668] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un polipéptido o una molécula de reconocimiento celular 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 por esterilización. Las dispersiones pueden prepararse incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión y otros ingredientes, 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 liofilización (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada estéril del mismo.

[0669] Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido y/o una molécula de reconocimiento celular de la invención está diseñada para administrarse mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, el agente de unión estará en forma de pirógeno libre, solución acuosa parenteralmente aceptable. Los procedimientos para preparar soluciones de proteínas parenteralmente aceptables, teniendo en cuenta el pH apropiado, la isotonicidad, la estabilidad y similares, están dentro de la habilidad en la técnica. Una composición

farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea contendrá, además de agentes aglutinantes, un vehículo isotónico tal como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de Ringer lactato u otro vehículo como conocido en el art. Una composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos bien conocidos por los expertos en la materia.

[0670] Como se describe en otra parte en el presente documento, se puede preparar un polipéptido y/o molécula de reconocimiento celular de la presente invención con vehículos que protegerán al agente terapéutico activo contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sistemas de liberación de fármacos de liberación sostenida y controlada (Robinson J, ed., Marcel Dekker, Inc., NY, EE. UU., 1978)).

[0671] En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención (por ejemplo, una composición farmacéutica y/o diagnóstica) puede formularse para asegurar una distribución in vivo deseada de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica excluye muchos compuestos grandes y/o hidrófilos. Para dirigir una molécula terapéutica o composición de la presente invención a una ubicación in vivo particular, pueden formularse, por ejemplo, en liposomas que pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a 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 proteína A tensioactivo; p120 catenina y similares.

[0672] Las composiciones farmacéuticas incluyen formulaciones parenterales diseñados para ser utilizados como implantes o sistemas de partículas. Ejemplos de implantes son formulaciones de depósito compuestas de componentes poliméricos o hidrófobos tales como emulsiones, resinas de intercambio iónico y soluciones salinas solubles. Ejemplos de sistemas de partículas son microesferas, micropartículas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas (véase, por ejemplo, Honda M et al., Int J Nanomedicine 8: 495-503 (2013); Sharma A et al., Biomed Res Int 2013: 960821 (2013); Ramishetti S, Huang L, Ther Deliv 3: 1429-45 (2012)). Las formulaciones de liberación controlada pueden prepararse usando polímeros sensibles a iones, tales como, por ejemplo, liposomas, polaxamer 407 e hidroxipatita.

#### IX. Polinucleótidos, vectores de expresión y células huésped de la presente invención

[0673] Más allá de los polipéptidos y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos y las moléculas de reconocimiento celular de la invención, o porciones funcionales de los mismos, también están abarcados dentro del alcance de la presente invención. El término "polinucleótido" es equivalente al término "ácido nucleico", cada uno de los cuales incluye uno o más de: 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 presente invención puede ser monocatenario, doble o triple. Dichos polinucleótidos se describen específicamente para incluir todos los polinucleótidos capaces de codificar una proteína de ejemplo, por ejemplo, teniendo en cuenta la oscilación 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 (ver Stothard P, Biotechniques 28: 1102-4 (2000)).

[0674] En un aspecto, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican un polipéptido efector de toxina Shiga y/o una molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o un fragmento o derivado del mismo. Los polinucleótidos pueden incluir, por ejemplo, una 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 un polipéptido o molécula de reconocimiento celular de la presente invención. La invención también incluye polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que se hibridan en condiciones estrictas con un polinucleótido que codifica el polipéptido efector de la toxina Shiga y/o la molécula de reconocimiento celular de la invención, o un fragmento o derivado del mismo, o el antisentido o complemento de cualquiera de tales secuencias.

[0675] Los derivados o análogos de las moléculas de la presente invención (por ejemplo, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención y las moléculas de reconocimiento celular que comprenden los mismos) incluyen, entre otras, moléculas de polinucleótidos (o polipéptidos) que tienen regiones que son sustancialmente homólogas a los polinucleótidos (o polipéptidos efectores de la toxina Shiga y moléculas de reconocimiento celular de la presente invención), por ejemplo, al menos aproximadamente 45%, 50%, 70%, 80%, 95%, 98%, o incluso 99% de identidad (con una identidad preferida del 80-99%) sobre una secuencia de polinucleótidos (o polipéptidos) del mismo tamaño o cuando se compara con una secuencia alineada en la que la alineación se realiza mediante un programa de homología por computadora conocido en la técnica. Un programa de ejemplo es el programa GAP (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para UNIX, Genetics Computer Group, University Research Park,

Madison, WI, EE. UU.) Que utiliza la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith T, Waterman M, Adv Appl Matemáticas 2: 482-9 (1981). También se incluyen polinucleótidos capaces de hibridarse con el complemento de una secuencia que codifica las proteínas de reconocimiento celular de la invención en condiciones rigurosas (ver, por ejemplo, Ausubel F et al., Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Nueva York, NY, EE. UU., 1993)) y a continuación. Los expertos en la materia conocen condiciones estrictas y se pueden encontrar, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY, EE. UU., Cap. 6.3.1-6.3.6 (1989)).

[0676] La presente invención proporciona además vectores de expresión que comprenden los polinucleótidos dentro del alcance de la presente invención. Los polinucleótidos capaces de codificar los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y/o las moléculas de reconocimiento celular de la invención pueden insertarse en vectores conocidos, incluidos plásmidos bacterianos, vectores virales y vectores de fagos, utilizando 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 polipéptidos efectores de toxina Shiga contemplados y/o moléculas de reconocimiento celular de la invención dentro de cualquier célula huésped de elección o sistemas de expresión libres de células (por ejemplo, pTxb1 y pIVEX2.3). Los polinucleótidos específicos que comprenden vectores de 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 y/o pueden adquirirse.

[0677] El término "vector de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido, lineal o circular, que comprende una o más unidades de expresión. El término "unidad de expresión" denota un segmento polinucleotídico que codifica un polipéptido de interés y capaz de proporcionar la expresión del segmento de ácido nucleico en una célula huésped. Una unidad de expresión 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 el contexto de la presente invención, un vector de expresión que codifica un polipéptido efector de toxina Shiga y/o una molécula de reconocimiento celular de la invención que comprende una cadena de polipéptidos única incluye al menos una unidad de expresión para la cadena de polipéptidos única, mientras que una proteína 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 un polipéptido efector de toxina) incluye al menos dos unidades de expresión, una para cada una de las dos cadenas de polipéptidos de la proteína. Para la expresión de proteínas dirigidas a células de múltiples cadenas de la invención, una unidad de 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 los vectores de expresión para cada cadena de polipéptidos tienen sido introducido).

[0678] 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 marcadores útiles que pueden emplearse se conocen en la técnica.

[0679] El término "célula huésped" se refiere a una célula que puede apoyar la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariontas, 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 un polipéptido y/o una molécula de reconocimiento celular de la presente invención se puede lograr usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

[0680] Los polipéptidos y/o proteínas efectoras de toxina Shiga dentro del alcance de la presente invención pueden ser variantes o derivados de los polipéptidos y moléculas descritos en el presente documento que se producen modificando el polinucleótido que codifica un polipéptido y/o componente proteínico de un objetivo celular molécula alterando uno o más aminoácidos o eliminando o insertando uno o más aminoácidos que pueden hacerlo más adecuado para lograr las propiedades deseadas, como una expresión más óptima por parte de una célula huésped.

#### X. Moléculas de la presente invención inmovilizadas en sustratos sólidos

[0681] Ciertas realizaciones de la presente invención incluyen una molécula de la presente invención (por ejemplo, un polipéptido efector de toxina Shiga, una molécula de reconocimiento celular, proteína de fusión o polinucleótido de la presente invención), o cualquier fragmento efector del mismo, inmovilizado en un sustrato sólido. Los sustratos sólidos contemplados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, microperlas, nanopartículas, polímeros, materiales de matriz, microarrays, placas de microtitulación o cualquier superficie sólida conocida en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US 7.771.955). De acuerdo con estas realizaciones, una molécula de la presente invención puede estar unida covalentemente o no covalentemente a un sustrato sólido, tal como, por



ejemplo, un cordón, partícula o placa, usando técnicas conocidas por el experto en la materia (véase, por ejemplo, Jung Y et al., *Analyst* 133: 697-701 (2008)). Las moléculas inmovilizadas de la invención pueden usarse para aplicaciones de detección usando técnicas conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Bradbury A et al., *Nat Biotechnol* 29: 245-54 (2011); Sutton C, *Br J Pharmacol* 166: 457-75 (2012); Diamante L y et al., *Protein Eng Des Sel* 26: 713-24 (2013); Houlihan G y et al., *J Immunol Methods* 405: 47-56 (2014)).

[0682] Los ejemplos de sustratos sólidos a la que una molécula de la invención puede ser inmovilizado sobre no limitantes incluyen: microperlas, nanopartículas, polímeros, nanopolymers, nanotubos, perlas magnéticas, perlas paramagnéticas, perlas superparamagnéticas, estreptavidina perlas recubiertas, de fase inversa magnético perlas, perlas terminadas en carboxi, perlas terminadas en hidrazina, perlas de sílice (sílice sódica) y perlas modificadas con ácido iminodiacético (IDA), perlas modificadas con aldehído, perlas activadas con epoxi, perlas modificadas con diaminodipropilamina (DADPA) (perlas con grupo de superficie de amina primaria), perlas poliméricas biodegradables, sustratos de poliestireno, partículas de amino-poliestireno, partículas de carboxil-poliestireno, partículas de epoxi-poliestireno, partículas de dimetilamino-poliestireno, partículas de hidroxipoliestireno, partículas coloreadas, partículas de citometría de flujo, partículas de sulfonato-poliestireno, superficies de nitrocelulosa, reforzadas membranas de nitrocelulosa, membranas de nylon, superficies de vidrio, superficies de vidrio activado, superficies de cuarzo activado, membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), sustratos a base de poliácridamida, sustratos de cloruro de polivinilo, sustratos de poli (metacrilato de metilo), sustratos de poli (dimetilsiloxano) y fotopolímeros que contienen especies fotorreactivas (como nitrenos, carbenos y radicales ketil) capaces de formando enlaces covalentes. Otros ejemplos de sustratos sólidos sobre los que se puede inmovilizar una molécula de la invención se usan comúnmente en sistemas de presentación molecular, tales como, por ejemplo, superficies celulares, fagos y partículas de virus.

#### XI Dispositivos de administración y kits

[0683] En ciertas realizaciones, la invención se refiere a un dispositivo que comprende una o más composiciones de materia de la presente invención, tal como una composición farmacéutica o composición de diagnóstico, para la administración a un sujeto que lo necesite. Por lo tanto, un dispositivo de administración que comprende una o más composiciones de la presente invención puede usarse para administrar a un paciente una composición de materia de la presente 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 por otros medios reconocidos por una persona experta en la técnica.

[0684] También están dentro del alcance de la presente invención los kits que comprenden al menos una composición de la materia de la invención, y opcionalmente, el embalaje 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 invención 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, una 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 presente invención, por ejemplo, tal como un procedimiento descrito aquí.

#### XII Procedimientos para usar moléculas de reconocimiento celular de la presente invención y/o composiciones farmacéuticas y/o diagnósticas de la misma

[0685] Generalmente, es un objeto de la presente invención proporcionar agentes farmacológicamente activos, así como composiciones que los comprendan, que puedan usarse en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones, tales como ciertos cánceres, tumores, anormalidades de crecimiento, trastornos inmunes, o condiciones patológicas adicionales mencionadas aquí. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos para usar los polipéptidos, las moléculas de reconocimiento celular y las composiciones farmacéuticas de la invención para la destrucción selectiva de células, para administrar materiales exógenos adicionales en las células seleccionadas, para marcar los interiores de las células seleccionadas, para recoger información de diagnóstico, para la administración de epítomos de células T a la ruta de presentación de MHC de clase I de células diana, y para tratar enfermedades, trastornos y afecciones como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención pueden usarse para prevenir o tratar cánceres, iniciación de cáncer, iniciación de tumor, metástasis y/o recurrencia de enfermedad.

[0686] En particular, es un objeto de la invención proporcionar tales agentes, composiciones y/o procedimientos farmacológicamente activos que tienen ciertas ventajas en comparación con los agentes, composiciones y/o procedimientos que se conocen actualmente en la técnica. De acuerdo con esto, la presente invención proporciona procedimientos para usar polipéptidos efectores de toxina Shiga y moléculas de reconocimiento celular con secuencias proteicas específicas y composiciones farmacéuticas de los mismos. Por ejemplo, cualquiera de las secuencias de aminoácidos en SEQ ID NOs: 6-354 y 370-513 se puede utilizar específicamente como un

componente de la molécula de reconocimiento celular utilizada en los siguientes procedimientos o cualquier procedimiento para usar una molécula de reconocimiento celular conocida para el trabajador calificado, tales como, por ejemplo, varios procedimientos descritos en WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/138435, WO 2015/138452, WO 2015/113005, WO 2015/113007, WO 2015/191764, US20150259428, 62/168,758, 62/168,759, 62/168,760, 62/168,761, 62/168,762, 62/168,763 y PCT/US2016/016580.

[0687] La presente invención proporciona procedimientos para matar una célula que comprende la etapa de poner en contacto la célula, in vitro o in vivo, con un polipéptido efector de toxina Shiga, una molécula de reconocimiento celular o una composición farmacéutica de la presente invención. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga, las moléculas de reconocimiento celular y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para matar un tipo de célula específico al contactar una célula o células con una de las composiciones de materia reivindicadas. En ciertas realizaciones, una molécula de reconocimiento celular o una composición farmacéutica de la presente invención puede usarse 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 molécula de reconocimiento celular o una composición farmacéutica de la presente invención puede usarse para matar células cancerosas en una mezcla de diferentes tipos de células. En ciertas realizaciones, se puede usar una molécula de reconocimiento celular Shiga citotóxica, o una 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, se puede usar un polipéptido efector de toxina Shiga, una molécula de reconocimiento celular o una composición farmacéutica de la presente invención para matar tipos de células específicos en una mezcla de tipos de células, tales como material tisular de preadministración para fines terapéuticos. En ciertas realizaciones, una molécula de reconocimiento celular o una 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. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga, las moléculas que se dirigen a las células y las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen diversas aplicaciones, que incluyen, por ejemplo, usos para agotar los tipos de células no deseadas de los tejidos in vitro o in vivo, usos en la modulación de las respuestas inmunes para tratar el injerto versus huésped, usos como agentes antivirales, usos como agentes antiparasitarios y usos en la purga de tejidos de trasplante de tipos de células no deseadas.

[0688] En ciertas realizaciones, ciertos polipéptidos efectores de toxina Shiga, moléculas de reconocimiento celular y composiciones farmacéuticas de la presente invención, solas o en combinación con otros compuestos o composiciones farmacéuticas, pueden mostrar una potente actividad de destrucción 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 dirigirse a la administración de polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga enzimáticamente activos y/o epítomos de células T que utilizan regiones de unión de alta afinidad a tipos de células específicos, las actividades de destrucción de células se pueden restringir a la eliminación específica y selectiva de ciertos tipos de células dentro de un organismo, tales como ciertas células cancerosas, células neoplásicas, células malignas, células tumorales no malignas y/o células infectadas.

[0689] La presente invención proporciona un procedimiento para matar una célula en un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar al paciente al menos una molécula de reconocimiento celular de la presente invención o una composición farmacéutica del mismo.

[0690] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular de la presente invención o las composiciones farmacéuticas de la misma pueden usarse para matar una célula cancerosa en un paciente dirigiéndose a una biomolécula extracelular que se encuentra físicamente acoplada con una célula cancerosa o tumoral. Los términos "célula cancerosa" o "célula cancerosa" se refieren a varias células neoplásicas que crecen y se dividen de manera anormalmente acelerada y/o no regulada y serán claras para la persona experta. El término "célula tumoral" incluye tanto células malignas como no malignas. 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 claros 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. Las enfermedades, trastornos y afecciones resultantes de cánceres y/o tumores (ya sean malignos o no malignos) que pueden beneficiarse de los procedimientos y composiciones de la presente invención dirigidos a ciertas células cancerosas y/o células tumorales serán claras para la persona experta. .

[0691] Ciertas realizaciones de las moléculas y composiciones dirigidas a células de la presente invención pueden usarse para destruir células madre cancerosas, células madre tumorales, células iniciadoras de cáncer premalignas y células iniciadoras de tumores, que comúnmente se dividen lentamente y resistente a terapias contra el cáncer como la quimioterapia y la radiación. Por ejemplo, las leucemias mieloides agudas (AML) se pueden tratar con la presente invención eliminando células madre de AML y/o células progenitoras de AML latentes (véase, por ejemplo,

Shlush L et al., Blood 120: 603-12 (2012)). Las células madre cancerosas a menudo sobreexpresan objetivos de la superficie celular, tales como, por ejemplo, CD44, CD200 y otros enumerados aquí, que pueden ser objetivos de ciertas regiones de unión de ciertas realizaciones de las moléculas de orientación celular de la presente invención (véase, por ejemplo, Kawasaki B et al. al., Biochem Biophys Res Commun 364: 778-82 (2007); Reim F et al., CancerRes 69: 8058-66 (2009)).

[0692] Debido al mecanismo de acción basado en la subunidad A de la toxina Shiga, las composiciones de materia de la presente invención pueden usarse más eficazmente en procedimientos que implican su combinación con otras terapias, o de manera complementaria, tales como, por ejemplo, quimioterapias, inmunoterapias, radiación, trasplante de células madre e inhibidores del punto de control inmunitario, y/o eficaz contra las células tumorales quimiorresistentes/resistentes a la radiación y/o en reposo/células iniciadoras de tumores/células madre. De manera similar, las composiciones de materia de la presente invención pueden usarse de manera más efectiva en procedimientos que implican en combinación con otras terapias dirigidas a células dirigidas a objetivos distintos del mismo epítipo, no superpuestos o diferentes para el mismo trastorno o afección de la enfermedad.

[0693] Ciertas realizaciones de las moléculas que se dirigen a las células de la presente invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, pueden usarse para matar una célula inmune (ya sea sana o maligna) en un paciente mediante reconocimiento de una biomolécula extracelular encontrada físicamente junto con una célula inmune.

[0694] Está dentro del alcance de la presente invención utilizar una molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o una composición farmacéutica de la misma, con el propósito de purgar poblaciones de células de pacientes (por ejemplo, médula ósea) de células T y/o células B malignas, neoplásicas o de otro modo no deseadas y a continuación reinfundir el material agotado de células T y/o células B en el paciente (véase, por ejemplo, van Heeckeren W et al., Br J Haematol 132: 42-55 (2006); (véase, por ejemplo, Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).

[0695] Está dentro del alcance de la presente invención utilizar la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o la composición farmacéutica de la misma, con el propósito de agotar ex vivo las células T y/o las células B de las poblaciones de células aisladas eliminadas de un paciente. En un ejemplo no limitativo, la molécula de reconocimiento celular de la invención puede usarse en un procedimiento para la profilaxis del rechazo de trasplantes de órganos y/o tejidos en el que el órgano o tejido donante se perfunde antes del trasplante con una molécula citotóxica de reconocimiento celular de la invención o una composición farmacéutica de la misma para purgar el órgano de las células T y/o células B del donante (véase, por ejemplo, Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).

[0696] También está dentro del alcance de la presente invención utilizar la molécula de reconocimiento celular de la invención, o la composición farmacéutica de la misma, con el fin de agotar las células T y/o células B de una población de células donantes como profilaxis contra la enfermedad del injerto contra el huésped, y la inducción de tolerancia, en un paciente para someterse a un trasplante de médula ósea o de células madre (ver, por ejemplo, van Heeckeren W et al., Br J Haematol 132: 42-55 (2006); (véase, por ejemplo, Alpdogan O, van den Brink M, Semin Oncol 39: 629-42 (2012)).

[0697] En ciertas realizaciones del polipéptido efector de la toxina Shiga o la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, pueden usarse para matar una célula infectada en un paciente mediante reconocimiento de una biomolécula extracelular encontrada físicamente junto con una célula infectada.

[0698] En ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se pueden usar para "sembrar" un locus dentro de un cordado con células presentadoras de péptidos epítopos de células T no propias para activar el sistema inmune para mejorar la vigilancia del locus. En ciertas realizaciones adicionales de este procedimiento de "siembra" de la presente invención, el locus es una masa tumoral o sitio de tejido infectado. En realizaciones preferidas de este procedimiento de "siembra" de la presente invención, el péptido-epítipo de células T no propio se selecciona del grupo que consiste en: péptidos que las células diana de la molécula que se dirigen a la célula no presentan ya, péptidos que no presente dentro de cualquier proteína expresada por la célula diana, péptidos no presentes dentro del proteoma o transcriptoma de la célula diana, péptidos no presentes en el microambiente extracelular del sitio a sembrar y péptidos no presentes en la masa tumoral o en el sitio del tejido infectado estar apuntando

[0699] Este procedimiento de "siembra" funciona para marcar una o más células diana dentro de un cordado con uno o más epítopos de células T de clase I del MHC para el reconocimiento por parte de las células T efectoras y la activación de las respuestas inmunes posteriores. Al explotar la internalización celular, el enrutamiento intracelular y las funciones de administración del epítipo de las células T de las moléculas que se dirigen a las células de la presente invención, las células diana que muestran el epítipo de las células T administrándolas se aprovechan para inducir el reconocimiento de la célula diana presente por el huésped Células T e inducción de respuestas inmunes adicionales, incluida la destrucción de células diana por CTL. Este procedimiento de "siembra" de usar una

molécula de reconocimiento celular de la presente invención puede proporcionar un efecto de vacunación temporal al inducir respuestas inmunes adaptativas para atacar las células dentro del microambiente sembrado, como, por ejemplo, una masa tumoral o un sitio de tejido infectado, ya sea presentar un epítipo (s) de células T administradas por molécula de reconocimiento celular o no. Este procedimiento de "siembra" también puede inducir la ruptura de la inmuno-tolerancia a una población de células diana, una masa tumoral y/o un sitio de tejido infectado dentro de un cordado.

[0700] Ciertos procedimientos de la presente invención que implican la siembra de un locus dentro de un cordado con uno o más epítopos antigénicos y/o inmunogénicos pueden combinarse con la administración de adyuvantes inmunológicos, ya sea administrados localmente o sistémicamente, para estimular la respuesta inmune a ciertos antígenos, tales como, por ejemplo, la administración conjunta de una composición de la presente invención con uno o más adyuvantes inmunológicos como una citocina, un producto bacteriano o una saponina vegetal. Otros ejemplos de adyuvantes inmunológicos que pueden ser adecuados para usar en los procedimientos de la presente invención incluyen sales y aceites de aluminio, tales como, por ejemplo, alumbre, hidróxido de aluminio, aceites minerales, escualeno, aceites de parafina, aceites de maní y timerosal.

[0701] Además, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que comprende la etapa de administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos una de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, o una composición farmacéutica de la misma. Las enfermedades, trastornos y afecciones contemplados que se pueden tratar con este procedimiento incluyen cánceres, tumores malignos, tumores no malignos, anomalías del crecimiento, trastornos inmunes e infecciones microbianas. La administración de una "dosificación terapéuticamente efectiva" de una composición de la presente 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.

[0702] La cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la presente invención dependerá de la vía de administración, el tipo de organismo que se está tratando, 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 apropiado para uso humano pueden guiarse por los resultados obtenidos por la presente invención, y pueden confirmarse en ensayos clínicos diseñados adecuadamente. Se puede determinar un protocolo eficaz de dosificación y tratamiento por medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y a continuación aumentando la dosis mientras se monitorean 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.

[0703] 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" generalmente se asocia con la inyección en o en comunicación con el sitio de acción previsto, incluyendo infraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardíaco, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterino, intravenoso, subaracnoideo., subcapsular, subcutánea, transmucosa o transtraqueal.

[0704] Para la administración de una composición farmacéutica de la presente invención, el intervalo de dosificación generalmente será de aproximadamente 0,001 a 10 miligramos por kilogramo (mg/kg) y más, generalmente de 0,001 a 0,5 mg/kg, del peso corporal del sujeto. Las dosis de ejemplo pueden ser 0,01 mg/kg de peso corporal, 0,03 mg/kg de peso corporal, 0,07 mg/kg de peso corporal, 0,9 mg/kg de peso corporal o 0,1 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 0,01 a 0,1 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 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.

[0705] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se administrarán típicamente al mismo paciente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser, por ejemplo, de dos a cinco 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 una composición de la presente invención incluyen la administración intravenosa de 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal con la composición administrada 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.

[0706] Una composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar a través de una o más vías de administración, usando uno o más de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración para las moléculas de reconocimiento celular y las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, por ejemplo, vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. Para otras realizaciones, una molécula de reconocimiento celular o una composición 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

[0707] Las moléculas de reconocimiento celular terapéuticas o composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar con una o más de una variedad de dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, una composición farmacéutica de la 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 administración 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.

[0708] La molécula de reconocimiento celular o la composición farmacéutica de la presente invención pueden administrarse solos o en combinación con uno o más otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. Una terapia de combinación puede incluir una molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o una composición farmacéutica de la misma, combinada con al menos otro agente terapéutico seleccionado en función del paciente, enfermedad o afección a tratar en particular. 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 activo, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo clásico o fragmento del mismo, o una molécula de ácido nucleico que modula una o más vías de señalización, y moléculas terapéuticas moduladoras similares que pueden complementarse o ser beneficiosas en un régimen de tratamiento terapéutico o profiláctico.

[0709] El tratamiento de un paciente con una molécula de reconocimiento celular o una composición farmacéutica de la presente invención conduce preferiblemente a la muerte celular de las células seleccionadas y/o la inhibición del crecimiento de las células seleccionadas. Como tal, las moléculas citotóxicas de reconocimiento celular de la presente 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, como, entre otros, el cáncer, tumores, otras anomalías de crecimiento, trastornos inmunes y células infectadas. La presente invención proporciona procedimientos para suprimir la proliferación celular y tratar trastornos celulares, que incluyen neoplasia, células B hiperactivas y células T hiperactivas.

[0710] En ciertas realizaciones, las moléculas de reconocimiento celular y las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden usar para tratar o prevenir cánceres, tumores (malignos y no malignos), anomalías de crecimiento, trastornos inmunes e infecciones microbianas. 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.

[0711] En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona procedimientos para tratar tumores malignos o neoplasias y otros cánceres asociados a células sanguíneas en un sujeto mamífero, tal como un ser humano, el procedimiento comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula citotóxica de reconocimiento celular o composición farmacéutica de la presente invención.

[0712] Las moléculas que se dirigen a las células y las composiciones farmacéuticas de la presente invención tienen diversas aplicaciones, que incluyen, por ejemplo, usos en la eliminación de células T no deseadas, usos en la modulación de respuestas inmunes para tratar 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 deseadas. Las moléculas de reconocimiento celular 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, maduración o propagación de células neoplásicas o malignas al inhibir el crecimiento y/o causar la muerte de cáncer o células tumorales.

[0713] En ciertas realizaciones, la molécula de reconocimiento celular o la composición farmacéutica de la presente invención se usa para tratar una enfermedad o trastorno mediado por células B, células plasmáticas o anticuerpos, como por ejemplo leucemia, linfoma, mieloma, Enfermedad relacionada con el virus de la inmunodeficiencia humana, amiloidosis, síndrome urémico hemolítico, poliarteritis, choque séptico, enfermedad de Crohn, artritis

reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, colitis ulcerosa, psoriasis, asma, síndrome de Sjögren, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de injerto, rechazo de injerto diabetes, vasculitis, esclerodermia y lupus eritematoso sistémico.

5 [0714] En otro aspecto, ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son agentes antimicrobianos, lo que significa que son capaces de tratar y/o prevenir la adquisición, desarrollo o consecuencias de infecciones microbiológicas patógenas, tales como causadas por virus, bacterias, hongos, priones o protozoos.

10 [0715] Está dentro del alcance de la presente invención proporcionar una profilaxis o tratamiento para enfermedades o afecciones mediadas por células T o células B administrando la molécula de reconocimiento celular de la presente invención, o una composición farmacéutica de la misma, a un paciente con el propósito de matar células T o células B en el paciente. Este uso es compatible con la preparación o el acondicionamiento de un paciente para trasplante de médula ósea, trasplante de células madre, trasplante de tejido o trasplante de órganos, independientemente de la  
15 fuente del material trasplantado, por ejemplo, fuentes humanas o no humanas.

[0716] Está dentro del alcance de la presente invención proporcionar un receptor de médula ósea para la profilaxis o el tratamiento de la enfermedad del huésped frente al injerto a través de la destrucción de células reconocidas de las células T del huésped utilizando una molécula citotóxica de reconocimiento celular o una composición farmacéutica de la presente invención.  
20

[0717] Ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular 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 eficaz de una molécula de reconocimiento celular y/o  
25 composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, el cáncer que se está tratando se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de hueso (tal como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), cáncer de seno, 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  
30 cáncer pancreático, cáncer paratiroideo, feocromocitoma, cáncer de glándula salival o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza y cuello (tal como cáncer nasofaríngeo, cáncer oral o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (tales como leucemia, linfoma o mieloma), cáncer de vías urinarias (como cáncer renal y cáncer de vejiga), cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura (tal como mesotelioma, carcinoma de pulmón de células pequeñas o carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata, sarcoma (tal como angiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi o sarcoma sinovial), cáncer de piel (tal como el carcinoma de células basales, carcinoma de células  
35 escamosas o melanoma) y cáncer uterino.

[0718] Ciertas realizaciones de las moléculas de reconocimiento celular y las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden utilizarse en un procedimiento para tratar un trastorno inmunitario que comprende  
40 administrar a un paciente, que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de las moléculas de reconocimiento celular y/o composición farmacéutica de la presente invención. En ciertas realizaciones de los procedimientos de la presente invención, 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, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, colitis ulcerosa y vasculitis.  
45

[0719] Entre ciertas realizaciones de la presente invención está usando el polipéptido efector de la toxina Shiga o la molécula de reconocimiento celular de la presente invención como un componente de una composición farmacéutica o medicamento para el tratamiento o prevención de un cáncer, tumor u otra anormalidad de crecimiento, trastorno  
50 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.  
55

[0720] Ciertas moléculas citotóxicas de reconocimiento celular citotóxicas de la presente invención, y sus composiciones, 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 direccionamiento puede seleccionarse o derivarse de diversos ligandos, tales como neurotransmisores y neuropéptidos, que se dirigen a tipos de células neuronales específicas uniéndose a receptores de superficie neuronal, tales como un receptor acoplado a proteína G específico de circuito neuronal. De manera similar, el dominio de direccionamiento puede seleccionarse o derivarse de anticuerpos que se unen a receptores de superficie neuronal. Debido a que ciertos polipéptidos efectores de la toxina Shiga dirigen de manera robusta su propio transporte axonal retrógrado, ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención pueden usarse  
60 para matar una (s) neurona (s) que expresa el objetivo extracelular en un sitio de inyección de proteína citotóxica  
65

5 distante del cuerpo celular (ver Llewellyn-Smith I et al., J. Neurosci Methods 103: 83-90 (2000)). Estas moléculas citotóxicas dirigidas de la invención que se dirigen específicamente a los tipos de células neuronales tienen usos en la investigación en neurociencia, 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, como el Parkinson y el Alzheimer (véase, por ejemplo, Hamlin A et al., PLoS One e53472 (2013)).

10 [0721] Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra un procedimiento para usar un polipéptido efector de toxina Shiga, una molécula de reconocimiento celular, una composición farmacéutica y/o una composición de diagnóstico de la presente invención para marcar o detectar los interiores de las células neoplásicas y/o tipos de células inmunes Este procedimiento puede basarse en la capacidad de ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención para ingresar tipos de células específicas y enrutarse dentro de las células a través del transporte intracelular retrógrado, a los compartimentos interiores de tipos de células específicas se les marca para su detección. Esto puede realizarse en células in situ dentro de un paciente o en células y tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

15 [0722] Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra un procedimiento para usar un polipéptido efector de toxina Shiga, una molécula de reconocimiento celular, una composición farmacéutica y/o una composición de diagnóstico de la presente invención para detectar la presencia de un tipo de célula con el propósito de recopilación de información sobre enfermedades, afecciones y/o trastornos. El procedimiento comprende poner en contacto una célula con una cantidad diagnósticamente suficiente de una molécula de reconocimiento celular de la presente invención para detectar la molécula mediante un ensayo o técnica de diagnóstico. La frase "cantidad de diagnóstico suficiente" se refiere a una cantidad que proporciona una detección adecuada y una 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 0,001 y 10 miligramos de la molécula de la célula de reconocimiento celular ligada al agente promotor de la detección de la invención por kg de sujeto por sujeto. Típicamente, la cantidad de polipéptido efector de toxina Shiga o molécula de reconocimiento celular de la invención utilizada en estos procedimientos de recopilación de información será tan baja como sea posible siempre que todavía sea una cantidad diagnóstica suficiente. Por ejemplo, para la detección in vivo en un organismo, la cantidad de polipéptido efector de toxina Shiga, molécula de reconocimiento celular o composición farmacéutica de la invención administrada a un sujeto será lo más baja posible.

20 [0723] El direccionamiento específico de tipo de célula de las moléculas de reconocimiento celular de la presente 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 la molécula de la invención. La obtención de imágenes de células que usan las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención puede realizarse in vitro o in vivo mediante cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. La información de diagnóstico se puede recolectar usando varios procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo imágenes de todo el cuerpo de un organismo o usando muestras ex vivo tomadas de un organismo. El término "muestra" usado en el presente documento se refiere a cualquier cantidad de cosas, pero sin limitación, 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 (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 los mencionados anteriormente (ver Kaur S et al., Cancer Lett 315: 97-111 (2012), para revisión).

25 [0724] Entre ciertas realizaciones de la presente invención se encuentra un procedimiento para usar un polipéptido efector de toxina Shiga, una molécula de reconocimiento celular o una composición farmacéutica de la presente invención en una composición de diagnóstico para marcar o detectar el interior de una célula hematológica, célula cancerosa, células tumorales, células infectadas y/o 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 ciertas moléculas de reconocimiento celular de la invención para ingresar tipos de células específicos 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 puede realizarse en células in situ dentro de un paciente o en células y tejidos extraídos de un organismo, por ejemplo, material de biopsia.

30 [0725] Las composiciones de diagnóstico de la presente invención pueden usarse para caracterizar una enfermedad, trastorno o afección como potencialmente tratable por una composición farmacéutica relacionada de la presente invención. En ciertas composiciones de la materia de la presente invención se puede usar 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 presente invención como se describe aquí o si es adecuado para utilizando un dispositivo de administración de la invención.

[0726] Las composiciones de diagnóstico de la presente invención pueden usarse después de que se detecta una enfermedad, por ejemplo, un cáncer, para caracterizarla mejor, tal como para monitorizar metástasis a distancia, 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, ciertos procedimientos de la invención pueden usarse para determinar si existe un problema local o sistémico.

[0727] Las composiciones de diagnóstico de la presente invención pueden usarse para evaluar las respuestas a las terapias independientemente del tipo de tipo de terapia, por ejemplo, fármaco de molécula pequeña, fármaco biológico o terapia basada en células. Por ejemplo, ciertas realizaciones de los diagnósticos de la invención se pueden usar para medir cambios en el tamaño del tumor, cambios en las poblaciones de células positivas para el antígeno, incluido el número y la distribución, o monitorear un marcador diferente al antígeno dirigido por una terapia que ya se está administrando a un paciente (véase Smith-Jones P y et al., Nat. Biotechnol 22: 701-6 (2004); Evans M y et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108: 9578-82 (2011)).

[0728] En ciertas realizaciones del procedimiento usado para detectar la presencia de un tipo de célula puede usarse para recopilar información sobre enfermedades, trastornos y afecciones, tales como, por ejemplo, cáncer de hueso (tal como mieloma múltiple o sarcoma de Ewing), mama cáncer, cáncer del sistema nervioso central/periférico (como cáncer cerebral, neurofibromatosis o glioblastoma), cáncer gastrointestinal (como cáncer de estómago o cáncer colorrectal), cáncer de células germinales (como cáncer de ovario y cáncer testicular, cáncer glandular (como pancreático) cáncer, cáncer de paratiroides, feocromocitoma, cáncer de glándulas salivales o cáncer de tiroides), cáncer de cabeza y cuello (como cáncer nasofaríngeo, cáncer oral o cáncer de faringe), cánceres hematológicos (como leucemia, linfoma o mieloma), riñón-urinario cáncer del tracto (como cáncer renal y de vejiga), 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 un ngiosarcoma, fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi o sarcoma sinovial), cáncer de piel (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 del injerto, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, síndrome urémico hemolítico, enfermedad relacionada con el VIH, lupus eritematoso, trastornos linfoproliferativos (incluidos los trastornos linfoproliferativos posteriores al trasplante), esclerosis múltiple, miastenia gramática, neuroinflamación, poliarteritis, psoriasis, artritis psoriásica, artritis reumatoide, esclerodermia, choque séptico, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, vasculitis, proliferación celular, inflamación, activación de leucocitos, adhesión de leucocitos, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica aguda T mia/linfoma (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 (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 plasmocítico, Linfoma MALT, linfoma de células del manto, mieloma múltiple (MM), leucemia de células asesinas naturales, linfoma nodal marginal de células B, linfoma no Hodgkin (NHL), leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma, linfoma de efusión primaria, leucemia pro linfocítica, promielocítico leucemia, linfoma linfocítico pequeño, linfoma esplénico de la zona marginal, 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 Waldenstrom macroglobulinemia

[0729] En ciertas realizaciones, los polipéptidos efectores de toxina Shiga y las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, o composiciones farmacéuticas de los mismos, se usan tanto para diagnóstico como para tratamiento, o para diagnóstico solo. En algunas situaciones, sería deseable determinar o verificar la(s) variante(s) de HLA y/o alelos de HLA expresados en el sujeto y/o tejido enfermo del sujeto, tal como, por ejemplo, un paciente que necesita tratamiento, antes de seleccionar un polipéptido efector de toxina Shiga o una molécula de reconocimiento celular de la invención para uso en el tratamiento(s).

[0730] Cualquier realización del polipéptido efector de la toxina Shiga de la presente invención y la molécula de reconocimiento celular de la presente invención (por ejemplo, las realizaciones de los conjuntos de realizaciones # 1-11 en el Resumen) pueden usarse con cada realización individual de los procedimientos de presente invención.

[0731] La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes de 1) polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención, 2) moléculas de reconocimiento celular de la presente invención, y 3) moléculas citotóxicas de reconocimiento celular de presente invención que comprende los polipéptidos mencionados anteriormente y capaz de reconocer específicamente ciertos tipos de células.

## EJEMPLOS

[0732] 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, que son



totalmente definitivos en cuanto a las condiciones y el alcance de esta invención. Los experimentos en los siguientes ejemplos se llevaron a cabo utilizando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa lo contrario.

5 [0733] Los siguientes ejemplos describen varios andamios de polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga citotóxica de ejemplo, que comprenden los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de la presente invención. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga en los Ejemplos están desinmunizados, a la vez que retienen actividades catalíticas y/o citotóxicas.

10 [0734] Los siguientes ejemplos también describen varias moléculas citotóxicas dirigidas a células, cada molécula que comprende un polipéptido efector de toxina Shiga unida, directa o indirectamente, a una región de unión de reconocimiento celular capaz de unir físicamente una parte extracelular de una biomolécula diana asociado con una superficie celular de una célula. Las moléculas de ejemplo, citotóxicas, de reconocimiento celular descritas a continuación se unen a la superficie celular, biomoléculas diana expresadas por tipos de células tumorales dirigidas a esas células diana. Las moléculas internalizadas de reconocimiento celular dirigieron eficazmente sus polipéptidos efectores de la toxina Shiga a los citoles de las células diana donde los polipéptidos efectores de la toxina Shiga inactivaron los ribosomas y posteriormente causaron la muerte apoptótica de las células diana. Los ejemplos de moléculas de reconocimiento celular de la invención son capaces de administrar eficazmente epítomos inmunogénicos de células T a la ruta MHC clase I de las células diana.

20 [0735] Además, algunas de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión de proteasa, inmunizados, que exhibieron mejores perfiles de inmunogenicidad in vivo (reducciones en las respuestas de anticuerpos) en comparación con las moléculas citotóxicas parentales que comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión de furina que no se había desinmunizado adicionalmente por la alteración de regiones epítomos endógenas adicionales. Además, estas moléculas de reconocimiento celular desinmunizadas, resistentes a la escisión de proteasa, de ejemplo muestran una tolerabilidad in vivo mejorada en comparación con las moléculas de reconocimiento celular relacionadas que comprenden más regiones de polipéptido efector de toxina Shiga sensibles a la escisión de proteasa.

30 [0736] Los siguientes ejemplos describen ciertos polipéptidos efectores de toxina Shiga de la presente invención y sus propiedades. Ciertos ejemplos describen polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados de la presente invención que comprenden epítomos de células T CD8 + integrados, heterólogos. Ciertos ejemplos describen polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados de la presente invención que son resistentes a la escisión por furina. Ciertos ejemplos describen polipéptidos efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión por furina, inmunizados, de la presente invención que comprenden epítomos de células T CD8 + heterólogos integrados. Ciertos ejemplos describen polipéptidos efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión por furina de la presente invención que comprenden epítomos de células T CD8 + integrados, heterólogos, con una desinmunización mínima. Además, los siguientes ejemplos describen ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención y sus propiedades. Ciertos ejemplos describen moléculas de reconocimiento celular de la presente invención en las que un componente polipeptídico efector de toxina Shiga (1) se desinmuniza; (2) está en o cerca de un extremo amino de un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular; (3) es resistente a la escisión por furina; y/o (4) comprende un epítomo de células T integrado o insertado. Ciertos ejemplos describen moléculas de reconocimiento celular en las que un componente polipeptídico de la molécula de reconocimiento celular comprende un motivo señal de retención/recuperación del retículo endoplásmico carboxi terminal.

### **Ejemplo 1. Identificación de regiones de epítomos endógenas en polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga**

50 [0737] Se analizaron secuencias de polipéptidos de las subunidades A de múltiples toxinas Shiga de la familia de toxinas Shiga para identificar epítomos putativos, antigénicos y/o inmunogénicos. Este ejemplo muestra cómo se pueden identificar los epítomos antigénicos e inmunogénicos en las subunidades A de la toxina Shiga y los polipéptidos relacionados (ver también WO 2015/113005; WO 2015/113007). Se utilizaron procedimientos computacionales para predecir epítomos antigénicos y/o inmunogénicos en varias subunidades A de toxina Shiga, incluida la utilización de datos disponibles públicamente sobre estructuras de proteínas. Tanto los epítomos de células B como los epítomos de células T CD4+ con un potencial para provocar respuestas inmunes se predijeron in silico. Las predicciones de epítomos se validaron empíricamente (ver Ejemplo 2, infra; WO 2015/113005; WO 2015/113007).

60 [0738] Se predijeron epítomos de células B lineales para la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A; SEQ ID NO: 1) a partir de la secuencia de polipéptido y datos estructurales 3D de la cadena A de toxina similar a Shiga (PDB ID: 1DM0\_A) por ProlImmune Inc. (Sarasota, FL, EE.UU.) utilizando su sistema REVEAL®.

65 [0739] En paralelo, se predijeron los epítomos de células B a partir en las secuencias de polipéptidos de las subunidades A de la toxina Shiga (StxA; SEQ ID NO: 2), toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A; SEQ ID NO: 1) y toxina

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

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

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

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

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

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

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

[0740] Hubo nueve regiones de epítomo de células B predichas en SLT-1A que se identificaron por más de un procedimiento como regiones superpuestas (Tabla 4).

**Tabla 4. Posibles regiones de epítomos de células B en subunidades A de la toxina Shiga prototípicas**

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

- 5 [0741] Además, las subunidades A de la toxina Shiga se analizaron utilizando el servidor web Epitopia para predecir epítomos de células B y los residuos inmunogénicos (Rubinstein N et al, BMC Bioinformatics 10: 287 (2009)). Epitopia se utilizó para identificar regiones de residuos de aminoácidos lineales que se prevé que sean inmunogénicas en SLT-1A basado en una puntuación de Epitopia de 4 o 5 ("alto") para la mayoría de los residuos de aminoácidos en una región de residuos de aminoácidos lineal.
- 10 [0742] El análisis Epitopia predijo que existe una región inmunogénica desde los residuos de aminoácidos 1 a 15 en SLT-1A (designada como "Región de Epítomo 1, véase la Tabla 5). Basándose en el análisis Epitopia, la región de epítomo inmunogénica 39-48 en SLT-1A (véase la Tabla 4) podría incluir la posición 49 (designada como "Región de Epítomo 3, véase la Tabla 5). En base al análisis Epitopia, la región de epítomo inmunogénica 55-66 en SLT-1A (véase la Tabla 4) podría incluir la posición 53 y se extiende a alrededor de la posición 62-66 (designada como "Región de epítomo 4", véase la Tabla 5), la región del epítomo 96-115 en SLT-1A (véase la Tabla 4) podría incluir la
- 15 posición 94 (designada como "Región de Epítomo 5", ver Tabla 5), y la región de epítomo región 180-190 en SLT-1A (véase la Tabla 4) podrían comenzar en la posición 179 y se extienden a alrededor de la posición 188-190 (designada como "región de epítomo 7", véase la Tabla 5).
- 20 **Tabla 5. Las subunidades A de la toxina Shiga prototípicas comparten diez posibles regiones de epítomo de células B**

Región de epítomo	posiciones de aminoácidos situados de forma nativa
1	1-15
2	26-37
3	39-49
4	53-66
5	94-115
6	141-153
7	179-190
8	243-257
9	254-268
10	285-293

- 25 [0743] Se predijeron epítomos de células T para la subunidad A madura de la toxina semejante a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) mediante el ensayo de células T del Sistema de Inmunogenicidad REVEAL™ (IS) realizado por ProlImmune, Inc. (Sarasota, FL, EE. UU.). Este ensayo utiliza múltiples péptidos solapantes de una proteína de interés para evaluar la activación de cualquier respuesta inmune por parte de células T CD4+ de mamíferos a partir de muestras de células donantes sanas agotadas de células T CD8+. El ensayo REVEAL™ de ProlImmune predijo siete epítomos de células T en SLT-1A (Tabla 6).
- 30 **Tabla 6. Posibles epítomos de células T CD4+ en una subunidad A de la toxina Shiga prototípica**

posiciones de aminoácidos situadas de forma nativa	Epítomo de células T #
4-33	1
34-78	2
77-103	3

128-168	4
160-183	5
236-258	6
274-293	7

[0744] Las diez regiones de epítipo de células B predichas (Tabla 5) se solaparon con al menos un epítipo de células T CD4+ predicho por el ensayo REVEAL™ (Tabla 7).

5 **Tabla 7. Regiones de epítipo de células B en subunidades A de toxina Shiga prototípicas se solapan con epítipos de células T CD4+ predichas**

Región de epítipo	posiciones de aminoácidos situadas de forma nativa	
	región de epítipo de células B	Epítipo(s) de células T
1	1-15	4-33
2	27-37	4-33; 34-78
3	39-48	34-78
4	53-66	34-78
5	94-115	77-103
6	141-153	128-168
7	179-190	160-183
8	243-257	236-258
0	254-268	236-258
10	285-293	274-293

10 [0745] Para mejorar los polipéptidos derivados de la toxina Shiga para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico en cordados, se construyeron diferentes polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga para ser inmunizados y resistentes a la escisión por furina, así como en algunos casos para comprender un, heterólogo, epítipo de células T CD8 + (denominado en el presente documento "células T CD8 + hiperinmunizadas"). Los epítipos de células T CD8 + se incrustaron o se insertaron en polipéptidos efectores de toxina Shiga diseñando subregiones internas de polipéptidos efectores de toxina Shiga para comprender un epítipo heterólogo de células T (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/113007). La inclusión o inserción de epítipos de células T heterólogas se puede usar para alterar una región o regiones de epítipos endógenos de células B y/o células T CD4 + para desinmunizar aún más un andamio derivado de la subunidad A de la toxina Shiga (WO) 2015/113007). Todas las regiones de epítipos de células B y epítipos de células T predichas en la Tabla 7 se interrumpieron y/o eliminaron individualmente o en combinación en los siguientes ejemplos.

20 **Ejemplo 2. Construcción y ensayo de ejemplos de polipéptidos efectores de toxina Shiga y moléculas de reconocimiento celular de la presente invención**

25 [0746] Este ejemplo describe la creación y prueba de varios andamios que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga que se desinmunizan, tales como, por ejemplo, como se muestra por reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad en relación con otros polipéptidos efectores de toxina Shiga. Además, algunos de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de este ejemplo son más resistentes a la escisión de la proteasa que los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje y/o comprenden epítipos de células T CD8 + heterólogos, integrados o insertados. Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga de este ejemplo se probaron como componentes de diversas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención.

Construcción de ejemplos de polipéptidos efectores de toxina Shiga (SLT-1A-combinación (n)) y moléculas de reconocimiento celular que comprenden la misma (SLT-1A-combinación (n)::scFv- (n))

35 [0747] Los polipéptidos efectores de la subunidad A de toxina Shiga desinmunizados se crearon y ensayaron en el contexto de moléculas de reconocimiento celular, cada una de las cuales comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina de reconocimiento celular unida a una región de polipéptido efector de toxina Shiga.

40 [0748] Para diseñar la resistencia a la escisión de la proteasa en los polipéptidos derivados de la subunidad A de la toxina Shiga, las sustituciones de residuos de aminoácidos, R248A y/o R251A, se introdujeron en los polipéptidos efectores de la toxina Shiga (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/191764). Las sustituciones R248A y R251A, individualmente o en combinación, interrumpen el motivo de escisión por furina en el extremo carboxi de la región del fragmento de toxina Shiga A1 y representan una o más mutaciones en el motivo mínimo de escisión por furina en relación con un tipo salvaje Subunidad A de toxina Shiga (véase WO 2015/191764).

45 [0749] Para este ejemplo, R248A y R251A se introdujeron en un polipéptido efector de toxina Shiga derivado de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) que comprende los aminoácidos 1-251 de SLT-1A (SEQ ID NO:

4) El doble mutante SLT-1A 1-251 R248A/R251A (SEQ ID NO: 5) se denomina en este documento SLT-1A resistente a la escisión por furina o más simplemente "SLT-1A-FR". La alteración del sitio mínimo de escisión con furina RxxR en el motivo de escisión con furina en el extremo carboxi de la región del fragmento de toxina Shiga A1 con R248A y R251A da como resultado una escisión disminuida por furina (véase el Ejemplo 3, infra; WO 2015/191764) Se predijo que la alteración del sitio mínimo de escisión por furina RxxR en el motivo de escisión por furina colocado de forma nativa a partir de los residuos de aminoácidos 238 a 257 en StxA y SLT-1A disminuirá la sensibilidad de esta región a la proteólisis por otras proteasas tales como, por ejemplo, proproteína convertasas y proteasas altamente promiscuas. Además, las mutaciones R248A y/o R251A interrumpen (1) la región del epítipo de células B # 8, que está situada de forma nativa en los residuos de aminoácidos 243-259 en StxA y SLT-1A, y (2) un epítipo de células T CD4 + colocado de forma nativa en los residuos de aminoácidos 236-258 en StxA y SLT-1A.

[0750] Los polipéptidos efectores de la toxina Shiga desimmunizados se crearon mediante la adición de múltiples sustituciones de residuos de aminoácidos para alterar las regiones predichas del epítipo de células B y/o células T CD4 +, incluidas las modificaciones que resultan en epítopos de células T CD8 + heterólogos integrados (ver Tabla 8; WO 2015/113005; WO 2015/113007). Con el fin de crear polipéptidos efectores de la toxina Shiga que se desimmunizaron aún más, SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5) se modificó para incluir múltiples sustituciones de residuos de aminoácidos para alterar las células T predichas de células B y/o CD4 + regiones de epítopos, que incluyen modificaciones que dan como resultado epítopos de células T CD8 + integrados y heterólogos (véase la Tabla 8; WO 2015/113005; WO 2015/113007). La Tabla 8 muestra veinte polipéptidos efectores de subunidad de toxina Shiga diferentes, desimmunizados, resistentes a la escisión de proteasa, denominados SLT-1A-combinación (n), donde n representa un número entero como 0, 1, 2, 3, etc. denotar diferentes variaciones. La numeración de las regiones del epítipo endógeno mencionadas en la Tabla 8 está de acuerdo con el esquema de numeración en las Tablas 6-7. Los polipéptidos efectores de toxina Shiga en la Tabla 8 se probaron como se describe en secciones posteriores.

25 Tabla 8. Ejemplos de polipéptidos efectores de toxina Shiga hiperimmunizados de células T CD8 + desimmunizados de ejemplo de la presente invención

nombre de SLT-1A-combinación <sub>(n)</sub>	Secuencia	Descripción resumida
SLT-1A-combinación0	SEQ ID NO: 6	región del epítipo 5 alterada por sustituciones de aminoácidos región del epítipo 5 alterada por epítipo de células T integrado región del epítipo 8 alterado por sustituciones de aminoácidos regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251AT epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento
SLT-1A-combinación1	SEQ ID NO: 7	región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado región del epítipo 8 alterado por sustituciones de aminoácidos regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento
SLT-1A-combinación2	SEQ ID NO: 8	región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por

		<p>sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones de aminoácidos                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación3	SEQ ID NO: 9	<p>región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones de aminoácidos                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación4	SEQ ID NO: 10	<p>región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones de aminoácidos                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación5	SEQ ID NO: 11	<p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones de aminoácidos                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  sitio de escisión por furina alterado</p>

		<p>por R248A/R251A  epítopo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por epítopo de células T integrado  epítopo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación6	SEQ ID NO: 12	<p>región del epítopo 3 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por epítopo de células T integrado  región del epítopo 5 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 7 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 8 alterada por sustituciones de aminoácidos  regiones del epítopo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento  epítopo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por epítopo de células T integrado  epítopo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación7	SEQ ID NO: 13	<p>región del epítopo 3 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por epítopo de células T integrado  región del epítopo 5 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 7 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 8 alterada por sustituciones  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A  regiones del epítopo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento  epítopo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por epítopo de células T integrado  epítopo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación21	SEQ ID NO: 27	<p>región del epítopo 3 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por epítopo de células T integrado  región del epítopo 5 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 7 alterada por</p>

		<p>sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 3 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación23	SEQ ID NO: 29	<p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 7 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 3 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación24	SEQ ID NO: 30	<p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 7 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 4 alterado por</p>



		sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento
SLT-1A-combinación25	SEQ ID NO: 31	región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 7 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 8 alterada por sustituciones sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado epítipo de células T # 3 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento
SLT-1A-combinación26	SEQ ID NO: 32	región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 7 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 8 alterada por sustituciones sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento
SLT-1A-combinación8	SEQ ID NO: 14	región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 7 alterada por

		<p>sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación9	SEQ ID NO: 15	<p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 7 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación10	SEQ ID NO: 16	<p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 6 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítopos de células T # 6 y # 7</p>

		alterados por truncamiento
SLT-1A-combinación11	SEQ ID NO: 17	<p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado</p> <p>región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 7 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 8 alterada por sustituciones</p> <p>sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A</p> <p>regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento</p> <p>epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos</p> <p>epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado</p> <p>epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos</p> <p>epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación12	SEQ ID NO: 18	<p>región del epítipo 1 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado</p> <p>región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 6 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 8 alterada por sustituciones</p> <p>sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A</p> <p>regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento</p> <p>epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos</p> <p>epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado</p> <p>epítipo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos</p> <p>epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos</p> <p>epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación13	SEQ ID NO: 19	<p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado</p> <p>región del epítipo 7 alterada por sustitución de aminoácidos</p> <p>región del epítipo 7 alterada por epítipo de células T integrado</p> <p>región del epítipo 8 alterada por</p>

		<p>sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
<p>SLT-1A-combinación14</p>	<p>SEQ ID NO: 20</p>	<p>región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 6 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 7 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado                  epítipo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
<p>SLT-1A-combinación15</p>	<p>SEQ ID NO: 21</p>	<p>región del epítipo 1 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos                  región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado                  región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 6 alterada por sustitución de aminoácidos                  región del epítipo 8 alterada por sustituciones                  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A                  regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento                  epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos                  epítipo de células T # 2 alterado por</p>

		<p>epítopo de células T integrado  epítopo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación16	SEQ ID NO: 22	<p>región del epítopo 1 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 3 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por epítopo de células T integrado  región del epítopo 5 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 6 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 7 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 8 alterada por sustituciones  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A  regiones del epítopo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento  epítopo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por epítopo de células T integrado  epítopo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación17	SEQ ID NO: 23	<p>región del epítopo 1 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 3 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por epítopo de células T integrado  región del epítopo 5 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 6 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 7 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 8 alterada por sustituciones  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A  regiones del epítopo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento  epítopo de células T # 1 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por epítopo de células T integrado  epítopo de células T # 4 alterado por</p>

		<p>sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación18	SEQ ID NO: 24	<p>región del epítopo 1 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 3 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por epítopo de células T integrado  región del epítopo 5 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 6 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 7 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 8 alterada por sustituciones  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A  regiones del epítopo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento  epítopo de células T # 1 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por epítopo de células T integrado  epítopo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento</p>
SLT-1A-combinación19	SEQ ID NO: 25	<p>región del epítopo 1 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 3 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos  región del epítopo 4 alterada por epítopo de células T integrado  región del epítopo 5 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 6 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 7 alterada por sustitución de aminoácidos  región del epítopo 8 alterada por sustituciones  sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A  regiones del epítopo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento  epítopo de células T # 1 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos  epítopo de células T # 2 alterado por epítopo de células T integrado  epítopo de células T # 4 alterado por</p>

		sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 5 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento
SLT-1A-combinación20	SEQ ID NO: 26	región del epítipo 3 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por sustituciones de aminoácidos región del epítipo 4 alterada por epítipo de células T integrado región del epítipo 5 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 6 alterada por sustitución de aminoácidos región del epítipo 8 alterada por sustituciones región del epítipo 8 alterada por epítipo de células T integrado sitio de escisión por furina alterado por R248A/R251A regiones del epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento epítipo de células T # 1 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 2 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 2 alterado por epítipo de células T integrado epítipo de células T # 4 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 6 alterado por sustituciones de aminoácidos epítipo de células T # 6 alterado por epítipo de células T integrado epítopos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento

[0751] Cada uno de los polipéptidos efectores de toxina Shiga desimmunizados SLT-1A-combinación (n) (SEQ ID NOs: 6-21, 23-27 y 29-32) comprenden una combinación de uno o más desimmunizados subregiones con una o más subregiones que comprende un epítipo de células T CD8 + integrado, heterólogo. La mayoría de estos polipéptidos también tienen un motivo de escisión por furina mínimo, alterado en el extremo carboxi de sus subregiones de fragmentos de toxina Shiga A1 (SEQ ID NO: 6-10, 13-21, 23-27 y 29-32) El análisis computacional in silico predijo (1) que al menos dos epítopos de células B presentes en la toxina Shiga de tipo salvaje StxA o SLT-1A se eliminaron para todos los combinación de polipéptidos efectores de toxina Shiga mencionados en la Tabla 8, y (2) que no se crearon nuevos epítopos de células B en ninguno de los combinación de polipéptidos efectores de toxina Shiga (n) enumerados en la Tabla 8. Las propiedades y consecuencias funcionales de muchas de las modificaciones a subregiones individuales en efector de toxina Shiga el combinación de polipéptidos (n) se describe en el Ejemplo 3, WO 2015/113005, WO 2015/113007 y WO 2015/191764.

[0752] Se crearon polinucleótidos que codifican construcciones de combinación de polipéptido efector de subunidad A de toxina Shiga y se fusionaron con construcciones que codifican una región de unión de tipo inmunoglobulina de reconocimiento celular usando técnicas conocidas por el experto. Los polinucleótidos resultantes codificaron moléculas de reconocimiento celular, cada una de las cuales es un polipéptido que comprende (1) una combinación, región de polipéptido efector de toxina Shiga SLT-1A-combinación (n), (2) una región de unión de reconocimiento celular "scFv- (n)" donde n representa un número entero como 1, 2, 3, etc. para denotar diferentes scFVs, y (3) un enlazador conocido en la técnica situado entre la región del polipéptido efector de la toxina Shiga y la región de unión.

[0753] Utilizando un sistema de expresión bacteriano conocido en la técnica, estos polinucleótidos se usaron para producir al menos veintisiete, combinación, desimmunizados, polipéptidos efectores de la toxina Shiga (Tabla 8; SEQ ID NO: 6-21, 23-27, y 29-32), en el contexto de una o más moléculas de reconocimiento celular. Después de unirse

a una región de unión de reconocimiento celular, veintiséis de los veintisiete andamios SLT-1A-combinación (n) produjeron una molécula estable, de longitud completa, catalíticamente activa, de reconocimiento celular. Sin embargo, la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación18::scFv-1 (SEQ ID NO: 54) mostró evidencia de inestabilidad porque se observó degradación de SLT-1A-combinación18::scFv-1 por dodecil sulfato de sodio (SDS), análisis electroforético en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de geles cargados y procesados con preparaciones de SLT-1A-combinación18::scFv-1 y una escalera de peso molecular como referencia.

A. Ensayo de las actividades de inhibición de ribosomas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo que comprenden los polipéptidos efectores de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n)

[0754] Las actividades enzimáticas de diversos polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión de proteasa, combinados, desimmunizados, se probaron en el contexto de una molécula de reconocimiento celular usando un ensayo de inhibición de ribosomas in vitro conocido por el experto (TNT). ® Kit de transcripción/traducción de acoplamiento rápido, Promega Corp., Madison, WI, EE. UU.) Este ensayo de traducción de proteínas in vitro y sin células se usó para determinar las capacidades de inactivación de ribosomas de SLT-1A-combinación10::scFv-1 (SEQ ID NO: 47), SLT-1A-combinación16::scFv-1 (SEQ ID NO: 52), SLT-1A-combinación19::scFv-1 (SEQ ID NO: 55), SLT-1A-combinación0::scFv-2 (SEQ ID NO: 57), SLT-1A-combinación2::scFv-2 (SEQ ID NO: 58), SLT-1A-combinación3::scFv-2 (SEQ ID NO: 59), SLT-1A-combinación4::scFv-2 (SEQ ID NO: 60) y SLT-1A-combinación13::scFv-2 (SEQ ID NO: 62).

[0755] La reacción actividad ribosoma se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se preparó una serie de diluciones de 10 veces de la molécula de reconocimiento celular a analizar en un tampón apropiado y se creó una serie de componentes de la mezcla de reacción TNT® idénticos para cada dilución. Cada muestra de la serie de dilución se combinó con cada una de las mezclas de reacción TNT® junto con el ADN de control Luciferasa T7 (Promega Corp., Madison, WI, EE. UU.). Las muestras de prueba se incubaron durante 1,5 horas a 30 grados Celsius (° C). Después de la incubación, se añadió reactivo de ensayo de luciferasa (Promega Corp., 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. Se utilizaron tres controles positivos: el fragmento SLT-1A1 de tipo salvaje (SLT-1A1-WT) (SEQ ID NO: 4) y dos moléculas de reconocimiento celular SLT-1A-FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34) y SLT-1A-FR::scFv-2 (SEQ ID NO: 35) que comprende el polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión de proteasa SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5) (ver WO 2015/191764) .

[0756] El nivel de inhibición de síntesis de proteínas se determinó por análisis de regresión no lineal de las concentraciones transformadas logarítmicamente de molécula de reconocimiento celular de total frente a unidades de luminiscencia relativas. Mediante el uso de software estadístico (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE. UU.), Se calculó el valor de la concentración inhibitoria media máxima (IC<sub>50</sub>) para cada muestra utilizando la función del software Prism de log (inhibidor) versus respuesta (tres parámetros) [Y = Inferior + ((Superior - Inferior)/(1 + 10 ^ (X - Log IC<sub>50</sub>)))] bajo el encabezado inhibición dosis-respuesta. El IC<sub>50</sub> para cada muestra se calculó y se muestra en la Tabla 9. En este ensayo, las mediciones de la inhibición de la síntesis de proteínas representan la actividad de inactivación de ribosomas de la molécula de la muestra, que es una métrica de la actividad catalítica de un polipéptido efector toxina Shiga o una subunidad A de toxina Shiga. Como se informa en los Ejemplos, se considera que una molécula que exhibe una IC<sub>50</sub> dentro de 10 veces de una IC<sub>50</sub> exhibida por una molécula de referencia exhibe actividad de inhibición de ribosomas comparable a esa molécula de referencia. Como se informa en los Ejemplos, se considera que una molécula que exhibe una IC<sub>50</sub> menor o dentro del 10 por ciento de una IC<sub>50</sub> exhibida por una molécula de referencia exhibe una actividad de inhibición de ribosomas equivalente a esa molécula de referencia.

**Tabla 9.** Combinación de polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa desimmunizados exhibieron actividad inhibitoria de ribosomas comparable a un fragmento A1 de la de la toxina Shiga de tipo salvaje

Muestra de proteína	IC <sub>50</sub> de inhibición del ribosoma (pM)
SLT-1A-combinación10::scFv-1	2,8
SLT-1A-combinación16::scFv-1	3,3
SLT-1A-combinación19::scFv-1	2,2
SLT-1A-FR::scFv-1	4,0
SLT-1A-combinación0::scFv-2	4,8
SLT-1A-combinación2::scFv-2	3,1
SLT-1A-combinación3::scFv-2	7,6
SLT-1A-combinación4::scFv-2	6,5
SLT-1A-combinación13::scFv-1	3,2
SLT-1A-FR::scFv-2	5,9



SLT-1A1-WT

4,8

[0757] Las actividades de inactivación de ribosomas de todos los polipéptidos efectores de toxina Shiga combinados (n) probados fueron comparables a la actividad catalítica de un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y/o un SLT-1A-FR polipéptido (SEQ ID NO: 5) como componente de una molécula de reconocimiento celular (Tabla 9; Figura 2). Las actividades de inactivación de ribosomas de SLT-1A-combinación10::scFv-1, SLT-1A-combinación16::scFv-1, SLT-1A-combinación19::scFv-1, SLT-1A-combinación0::scFv-2, SLT-1A-combinación2::scFv-2, SLT-1A-combinación4::scFv-1 y SLT-1A-combinación13::scFv2 fueron equivalentes a la actividad catalítica de un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4) y/o un polipéptido SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5) como componente de una molécula de reconocimiento celular (Tabla 9; Figura 2).

[0758] Estos resultados demuestran que las actividades de inhibición de los ribosomas de ciertos polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión de la proteína, determinados, de ejemplo, combinados, a modo de ejemplo, en el contexto de una molécula de reconocimiento celular, eran comparables a la actividad catalítica de una naturaleza salvaje. El fragmento de toxina A1 tipo Shiga (SEQ ID NO: 4) solo o el polipéptido efector de toxina Shiga SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5) en el contexto de una molécula de reconocimiento celular (Tabla 9; Figura 2). Por lo tanto, las actividades catalíticas de ciertos polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión de proteasa, combinados, de ejemplo, combinados, en el contexto de una molécula de reconocimiento celular, parecían comparables en este ensayo a la actividad catalítica de una toxina Shiga de tipo salvaje Una subunidad (Tabla 9; Figura 2).

B. Ensayo de la citotoxicidad dirigida de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga SLT-1A-combinación (n)

[0759] La potencia y la especificidad de la citotoxicidad se probaron para la combinación, desinmunizado, de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n) de la presente invención como armazones para construir diversas moléculas de reconocimiento celular. Las actividades citotóxicas de las moléculas de ejemplo de reconocimiento celular que comprenden una combinación de inmunogénica, resistente a la escisión de la proteasa, el polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n) se determinaron usando un ensayo de destrucción celular positivo de biomolécula diana conocido por los expertos trabajador. Este ensayo de destrucción celular objetivo positivo se usó para determinar las actividades citotóxicas de diversas moléculas de reconocimiento celular, cada una de las cuales comprende una región de unión de reconocimiento celular scFv- (n) genéticamente fusionada a uno de los polipéptidos SLTA-1A de combinación de efectores de toxinas Shiga. combinación (n) (SEQ ID NOs: 6-32) (ver la Tabla 8 para un subconjunto representativo de tales moléculas) para formar las moléculas de reconocimiento celular SEQ ID NOs: 43-81.

[0760] Las citotoxicidades de las moléculas de reconocimiento celular que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados, resistentes a la escisión de la proteasa, se determinaron usando células que expresan, en una superficie celular, cantidades significativas de la biomolécula diana extracelular apropiada, como un objetivo de la región de unión scFv-1-8. Las regiones de unión derivadas de inmunoglobulina scFv-1, scFv-2, scFv-3, scFv-4, scFv-5, scFv-6, scFv-7, scFv-8 y scFv-9 se unen con alta afinidad a un humano biomolécula diana físicamente acoplada a las superficies celulares de ciertas células humanas. Las células utilizadas en este ejemplo fueron células tumorales humanas inmortalizadas disponibles de ATCC (Manassas VA, EE. UU.), Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. (Frederick, MD, EE. UU.) Y/o DSZM (Braunschweig, DE). Las células a las que se hace referencia a continuación fueron H929, Daudi, NIC-ADR/RES (que expresa HER-2 de un vector transfectado), HCC1419, MDA-MB-231, MOLP-8, ST486, HDLM-2 y L1236 o más simplemente células -Líneas A, B, C, D, E, F, G, H e I, respectivamente. Usando un procedimiento conocido por el experto, las células de la línea celular C usadas en este ejemplo se transfectaron con un vector de expresión y se hizo que expresaran una cantidad significativa de HER-2 de la superficie celular.

[0761] El ensayo de destrucción celular se realizó de la siguiente manera. Ciertas células de línea celular de tumor humano se sembraron en placas (a aproximadamente  $2 \times 10^3$  células por pocillo) en medio de cultivo celular de 20 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) en placas de 384 pocillos. Se preparó una serie de diluciones de 10 veces de las moléculas de reconocimiento celular a analizar en un tampón apropiado, y se añadieron  $5 \mu\text{L}$  de las diluciones o control de tampón a las células en placa. Los pocillos de control que contenían solo medio de cultivo celular se usaron para la corrección basal. Las muestras de células se incubaron con las moléculas de reconocimiento celular o simplemente con tampón durante tres o cinco días a  $37^\circ\text{C}$  y en una atmósfera de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) al cinco por ciento. 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 Corp., Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0762] El porcentaje de viabilidad de los pozos experimentales se calculó utilizando la siguiente ecuación: (Prueba RLU - Promedio de medios RLU)/(Promedio de células solamente RLU - Promedio de medios RLU) \* 100. El logaritmo de la concentración de la molécula de reconocimiento celular frente al porcentaje de viabilidad se trazó en

Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE. UU.), y se usó el análisis log (inhibidor) versus respuesta (3 parámetros) para determinar el valor de la concentración citotóxica semimáxima (CD<sub>50</sub>) para la molécula de reconocimiento celular probada. El CD<sub>50</sub> para cada muestra se calculó y se muestra en la Tabla 10. Cuando los valores de CD<sub>50</sub> no se pudieron calcular en función de la forma de la curva sobre las concentraciones analizadas, se observó que el valor máximo de CD<sub>50</sub> supera el valor máximo analizado., por ejemplo, mayor que 100 nM ("> 100,000 nM") o 200 nM ("> 200,000 nM"), para muestras que no mataron al 50% de las células en la concentración de muestra más alta, analizada, por ejemplo, 100,000 nM o 200.000 nM. Si la viabilidad celular en el ensayo fue aproximadamente del 50% a la concentración de muestra más alta probada, entonces el valor de CD<sub>50</sub> para esa molécula se observó en la Tabla 10 como aproximadamente la concentración máxima probada donde la viabilidad celular fue aproximadamente del 50%, por ejemplo, " ~ 100.000 nM ". Como se informa en los Ejemplos, se considera que una molécula que exhibe un CD<sub>50</sub> dentro de 10 veces de un CD<sub>50</sub> exhibido por una molécula de referencia exhibe actividad citotóxica comparable a esa molécula de referencia.

**Tabla 10.** Polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión por proteasa desimmunizados de ejemplo exhibieron una potente citotoxicidad

Molécula de reconocimiento celular	CD <sub>50</sub> (nM)	CD <sub>50</sub> (nM)	
Conjunto 1 – scFv-1	línea celular A positiva de reconocimiento de scFv-1	línea celular B positiva de reconocimiento de scFv-1	
<b>Experimento 1</b>			
SLT-1A-combinación 10::scFv-1	0,025	0,079	
SLT-1A-combinación 16::scFv-1	0,032	0,115	
SLT-1A-combinación 19::scFv-1	0,032	0,157	
SLT-1A-FR::scFv-1	0,014	0,045	
<b>Experimento 2</b>			
SLT-1A-combinación 17::scFv-1	0,040	~ 100.000	
SLT-1A-combinación 18::scFv-1	> 100.000	> 100.000	
SLT-1A-FR::scFv-1	0,007	0,048	
SLT-1A-WT	> 100.000	> 100.000	
<b>Experimento 3</b>			
SLT-1A-combinación 7::scFv-1	0,026		
SLT-1A-FR::scFv-1	0,017		
Molécula de reconocimiento celular	CD <sub>50</sub> (nM)	CD <sub>50</sub> (nM)	CD <sub>50</sub> (nM)
Conjunto 1, Experimento 3 (cont.)	línea celular F positiva de reconocimiento de scFv-1	línea celular G positiva de reconocimiento de scFv-1	línea celular H positiva de reconocimiento de scFv-1
SLT-1A-combinación 7::scFv-1	0,386	0,133	> 100.000
SLT-1A-FR::scFv-1	0,283	0,099	> 100.000
<b>Experimento 4</b>			
SLT-1A-combinación 1::scFv-1	0,017	0,024	
SLT-1A-combinación 10::scFv-1	0,027	0,068	
SLT-1A-combinación 12::scFv-1	0,067	0,182	
SLT-1A-combinación 15::scFv-1	0,054	0,094	
SLT-1A-combinación 17::scFv-1	0,088	0,162	
SLT-1A-FR::scFv-1	0,013	0,020	
<b>Experimento 5</b>			
SLT-1A-combinación 7::scFv-1	línea celular A positiva de reconocimiento de scFv-1	línea celular F positiva de reconocimiento de scFv-1	línea celular G positiva de reconocimiento de scFv-1
	0,01	0,12	0,02

ES 2 847 373 T3

SLT-1A-combinación 9::scFv-1	0,01	0,14	0,04
SLT-1A-combinación 9::scFv-1	0,01	0,33	0,13
SLT-1A-combinación 11::scFv-1	0,02	0,67	0,55
<b>Experimento 6</b>			
	línea celular A positiva de reconocimiento de scFv-1	línea celular B positiva de reconocimiento de scFv-1	línea celular F positiva de reconocimiento de scFv-1
SLT-1A-combinación 10::scFv-1	0,03	0,25	0,84
SLT-1A-combinación 20::scFv-1	0,17	0,79	3,21
<b>Molécula de reconocimiento celular</b>	<b>CD<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>CD<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>CD<sub>50</sub> (nM)</b>
<b>Conjunto 2, scFV-2</b>	línea celular A positiva de reconocimiento de scFv-2	línea celular B positiva de reconocimiento de scFv-2	línea celular G positiva de reconocimiento de scFv-2
<b>Experimento 7</b>			
SLT-1A-combinación 0::scFv-2	1,52	17,2	
SLT-1A-combinación 3::scFv-2	0,68	3,18	
SLT-1A-combinación 4::scFv-2	0,08	0,44	
SLT-1A-FR::scFv-2	0,01	0,06	
<b>Experimento 8</b>			
SLT-1A-combinación 2::scFv-2	2,206	1,70	0,798
SLT-1A-combinación 13::scFv-2	> 100.000	> 100.000	> 100.000
SLT-1A-FR::scFv-2	0,119	0,171	0,112
<b>Experimento 9</b>			
SLT-1A-combinación 22::scFv-2	0,059	0,259	0,110
SLT-1A-FR::scFv-2	0,041	0,172	0,070
<b>Experimento 10 scFv-3</b>			
	línea celular B positiva de reconocimiento de scFv-3	línea celular G positiva de reconocimiento de scFv-3	línea celular A positiva de reconocimiento de scFv-3
scFv3::SLT-1A-combinación 5	73,80	5,48	> 200.000
scFv3::SLT-1A-combinación 6	54,70	1,01	> 200.000
scFv3::SLT-1 <sup>a</sup>	119,00	0,79	> 200.000
<b>Experimento 11 scFv-4</b>			
	línea celular C positiva de reconocimiento de scFv-4	línea celular D positiva de reconocimiento de scFv-4	línea celular E positiva de reconocimiento de scFv-4
SLT-1A-combinación 7::scFv-4	0,045	0,059	> 200.000
SLT-1A-combinación 14::scFv-4	0,065	0,079	> 200.000
SLT-1A-FR::scFv-4	0,012	0,018	> 200.000
<b>Molécula de reconocimiento celular</b>	<b>CD<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>CD<sub>50</sub> (nM)</b>	<b>CD<sub>50</sub> (nM)</b>
<b>Conjunto 3, scFV-5</b>			
<b>Experimento 12</b>			
	línea celular I positiva de reconocimiento de scFv-5	línea celular B positiva de reconocimiento de scFv-5	
SLT-1A-combinación 7::scFv-5	0,037	0,029	
SLT-1A-FR::scFv-5	0,012	0,012	
<b>Experimento 13</b>			
SLT-1A-combinación 9::scFv-5	0,064		
SLT-1A-combinación	0,376		

9::scFv-5			
SLT-1A-combinación 11::scFv-5	~ 100.000		
SLT-1A-FR::scFv-5	0,011		
<b>Conjunto 4, scFV-6</b>	línea celular I positiva de reconocimiento de scFv-6	línea celular B positiva de reconocimiento de scFv-6	
<b>Experimento 14</b>			
SLT-1A-combinación 7::scFv-6	0,037	0,157	
SLT-1A-FR::scFv-6	0,075	0,038	
<b>Experimento 15</b>			
SLT-1A-combinación 8::scFv-6	1.699		
SLT-1A-combinación 9::scFv-6	~ 100.000		
SLT-1A-FR::scFv-6	0,204		
<b>Experimento 16</b>			
SLT-1A-combinación 7::scFv-6	0,240		
SLT-1A-combinación 21::scFv-6	1,900		
SLT-1A-combinación 23::scFv-6	0,260		
SLT-1A-combinación 24::scFv-6	0,310		
SLT-1A-FR::scFv-6	0,130		
<b>Experimento 17</b>			
	línea celular I positiva de reconocimiento de scFv-6		
SLT-1A-combinación 7::scFv-6	0,500		
SLT-1A-combinación 25::scFv-6	0,100		
SLT-1A-combinación 26::scFv-6	0,730		
<b>scFv-8 Experimento 18</b>			
	línea celular B positiva de scFv-8	línea celular A positiva de scFv-8	
SLT-1A-combinación 0::scFv-8	0,077	> 100.000	
SLT-1A-FR::scFv-8	0,440	> 100.000	

5 [0763] Los valores de CD<sub>50</sub> para las moléculas de direccionamiento de células basadas en el andamio SLT-1A combinadas a modo de ejemplo se muestran en la Tabla 10 y los datos del ensayo de destrucción de células asociados se muestran en las Figuras 3-10. Estos resultados muestran los resultados del ensayo de destrucción celular para al menos treinta y cuatro moléculas únicas de reconocimiento celular, cada una de las cuales comprende una combinación, inmunizado, del polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n) seleccionado de al menos veintiséis Polipéptidos efectores de toxina Shiga (SEQ ID NO: 6-27 y 29-32). Treinta y dos de treinta y cuatro polipéptidos efectores de la toxina Shiga combinados, inmunizados, SLT-1A-combinación (0-12, 14-17, 19-21, 23-27 y 29-32) citotóxicos efectuados, en el contexto de una molécula de reconocimiento celular, caracterizada por valores de CD<sub>50</sub> iguales o inferiores a 100 nM, mientras que dos moléculas dirigidas a la célula, que comprenden SLT-1A-combinación13 (SEQ ID NO: 19) y SLT-1A-combinación18 (SEQ ID NO: 24), presentaron citotoxicidades caracterizadas por valores de CD<sub>50</sub> mayores de 100 nM hacia las dos líneas celulares analizadas (Tabla 10; Figuras 6-7).

15 [0764] Los resultados informados en la Tabla 10 muestran que las moléculas de reconocimiento celular que comprenden SLT-1A-combinación0, SLT-1A-combinación1, SLT-1A-combinación4, SLT-1A-combinación7, SLT-1A-combinación8, SLT-1A-combinación9, SLT-1A-combinación10, SLT-1A-combinación11, SLT-1A-combinación12, SLT-1A-combinación14, SLT-1A-combinación15, SLT-1A-combinación16, SLT-1A-combinación17, SLT-1A-combinación19, o SLT-1A-combinación25 mostró citotoxicidades potentes caracterizadas por valores de CD<sub>50</sub> de 0.2 nM o menos dependiendo de la línea celular analizada (Tabla 10; Figuras 3-10). Las citotoxicidades de la mayoría de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga combinados (n) probados como un componente de una molécula de reconocimiento celular fueron comparables a las citotoxicidades de un polipéptido SLT-1A-FR (SEQ ID

NO: 5) como un componente de una molécula de reconocimiento celular relacionada (Tabla 10; Figuras 3-7; 9-10). Por ejemplo, las citotoxicidades de al menos un tipo de célula probadas para al menos una molécula de reconocimiento celular que comprende uno de los combinación de polipéptidos efectores de la toxina Shiga (0-2, 4, 7-8, 10, 12, 14-19, o 23-26) fueron comparables a las citotoxicidades de moléculas relacionadas, de reconocimiento celular que comprenden un polipéptido SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5) (Tabla 10; Figuras 3-7; 9-10).

[0765] La especificidad de las citotoxicidades de las moléculas de ejemplo de reconocimiento celular que comprenden ciertos polipéptidos efectores de la toxina Shiga combinados, desimmunizados, combinados SLT-1A-n (n) se determinaron usando ensayos de destrucción celular objetivo negativa conocidos por los expertos trabajador. El ensayo de destrucción de células negativas a la biomolécula objetivo es idéntico al ensayo de destrucción de células positivo a las células excepto el tipo de célula utilizado. El ensayo de destrucción celular objetivo negativo se realizó usando células que no expresan cantidades significativas de la biomolécula objetivo extracelular unida con alta afinidad por la respectiva región de unión scFv- (n) de la molécula objetivo celular que se está probando. Las especificidades citotóxicas de las moléculas de ejemplo de reconocimiento celular que comprenden ciertos andamiajes de polipéptidos efectores de la toxina Shiga combinados, desimmunizados y combinados SLT-1A-combinación (n) se determinaron comparando los resultados de los ensayos de destrucción celular positiva con los resultados del objetivo. ensayos negativos de destrucción celular (véase, por ejemplo, la Tabla 10; Figuras 8-9). Las moléculas citotóxicas de reconocimiento celular que comprenden polipéptidos efectores de la toxina Shiga desimmunizados SLT1-A-combinación (5-7, 14 o 21) o SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5) no mataron porcentajes comparables del objetivo células negativas en comparación con células positivas objetivo en las mismas concentraciones de molécula de reconocimiento celular (Tabla 10; Figuras 8-9).

#### C. Ensayo para la activación de caspasa inducida por moléculas de reconocimiento celular de ejemplo que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga SLT-1A-combinación (n)

[0766] La apoptosis es una muerte celular programada que implica la degradación de los componentes celulares por caspasas. La apoptosis puede detectarse mediante el control de la actividad de las caspasas efectoras 3 y 7, como, por ejemplo, el estado de activación de la caspasa 3 o la caspasa 7. La activación de la caspasa de moléculas de ejemplo de reconocimiento celular que comprenden una combinación de proteasa desimmunizada -complejos resistentes a la escisión, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n) de la presente invención se determinaron usando un ensayo de actividad caspasa de células positivas para biomoléculas diana conocido por el experto. El procedimiento del ensayo de actividad de caspasa de células diana blanco es análogo al ensayo de destrucción de células diana positivo descrito anteriormente.

[0767] La actividad catalítica de la toxina Shiga puede inducir apoptosis de células de mamífero intoxicadas con toxina Shiga a través de una ruta intrínseca (véase, por ejemplo, Inward C et al., J Infect 30: 213-8 (1995); Fujii J et al., Infect Immun 71: 2724-35 (2003); Jandhyala D et al., Curr Top Microbiol Immunol 357: 41-65 (2012); Tesh V, Curr Top Microbiol Immunol 357: 137-78 (2012)). La activación de caspasa se puede usar como una lectura para la activación de mecanismos apoptóticos que conducen a la muerte celular (ver Pop C, Salvesen G, J Biol Chem 284: 21777-81 (2009); Nicholls S, Hyman B, Methods Enzymol 544: 251- 69 (2014)). La potencia y la especificidad de la activación de la caspasa inducida por la combinación de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión de la proteína, inmunizados y combinados, SLT-1A-combinación7 y SLT-1A-combinación14 en el contexto de las moléculas de reconocimiento celular se determinaron de la siguiente manera.

[0768] La activación de la caspasa de las moléculas de reconocimiento celular que comprenden andamios de polipéptidos efectores de la toxina Shiga resistentes a la escisión de la inmunización, inmunizados, se determinó usando células que expresan, en una superficie celular, cantidades significativas de una biomolécula diana extracelular de la región de unión scFv- 1 o scFv-6.

[0769] El ensayo de activación de caspasa se realizó como sigue. Ciertas células de líneas celulares de tumor humano se sembraron (a aproximadamente  $2-8 \times 10^3$  células por pocillo) en medio de cultivo celular de 20 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) en placas de 384 pocillos. Se preparó una serie de diluciones de 10 veces de las moléculas de reconocimiento celular a analizar en un tampón apropiado, y se añadieron  $5 \mu\text{L}$  de las diluciones o control de tampón a las células en placa. Los pocillos de control que contenían solo medio de cultivo celular se usaron para la corrección basal. Las muestras de células se incubaron con las moléculas de reconocimiento celular o simplemente con tampón durante 18-20 horas a  $37^\circ\text{C}$  y en una atmósfera de cinco por ciento de  $\text{CO}_2$ . La activación de caspasa se determinó usando una lectura luminiscente usando el ensayo de viabilidad de células luminiscentes Caspase-Glo 3/7® (Promega Corp., Madison, WI, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0770] La cantidad de activación de caspasa en pozos experimentales se calculó usando la siguiente ecuación:  $((\text{Test RLU} - \text{Promedio de medios RLU}) / (\text{Promedio de células RLU} - \text{Promedio de medios RLU})) * 100$ . El logaritmo de la concentración de la molécula de reconocimiento celular La activación versus la caspasa se trazó en Prism (GraphPad Prism, San Diego, CA, EE. UU.) y se usó el análisis log (agonista) versus la respuesta (3 parámetros) para cada molécula probada de reconocimiento celular para calcular la concentración efectiva semimáxima ( $\text{EC}_{50}$ )

para la activación de caspasa en el ensayo (Figuras 11-12; Tabla 11). El porcentaje máximo de actividad de caspasa (el porcentaje de activación sobre las medidas de control de "solo células") para cada experimento (actividad máxima) se calculó usando mediciones de activación de caspasa de muestras con "solo células" como línea de base (Tabla 11). La CE<sub>50</sub> y la actividad máxima para la activación de caspasa para las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo se muestran en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Activación de caspasa inducida por moléculas de reconocimiento celular resistentes a escisión pro proteasa desinmunizadas de ejemplo

Molécula de reconocimiento celular	EC <sub>50</sub> de actividad de caspasa (nM)	Actividad máxima (%)	EC <sub>50</sub> de actividad de caspasa (nM)	Actividad máxima (%)
	línea celular A positiva de scFv-1		línea celular F positiva de scFv-1	
SLT-1A-combinación 7::scFv-1	0,072	562	0,066	245
SLT-1A-combinación 14::scFv-1	0,083	534	0,094	245
SLT-1A-FR:scFv-1	0,054	561	0,045	250
	línea celular H positiva de scFv-7		línea celular I positiva de scFv-7	
SLT-1A-combinación 7::scFv-7	2,410	219	0,210	216
SLT-1A-FR:scFv-7	0,860	335	0,050	234

[0771] La actividad de la caspasa en las células diana inducida por los combinaciones 7 y 14 del polipéptido efector de la toxina Shiga, cada una probada como un componente de una molécula de reconocimiento celular, era comparable a la actividad de la caspasa inducida por el polipéptido SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5) como un componente de una molécula relacionada, de reconocimiento celular (SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 39, respectivamente) para la mayoría de las líneas celulares analizadas (Tabla 11; Figuras 11-12).

#### D. Mutaciones que alteran el epítipo endógeno en polipéptidos efectores de toxina Shiga

[0772] Este ejemplo muestra que los polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga pueden desinmunizarse con ciertos truncamientos y combinaciones de sustituciones de residuos de aminoácidos. Se realizaron delecciones y/o sustituciones de aminoácidos en los supuestos epítopos de células B y/o células T de polipéptidos efectores de la toxina Shiga derivados de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) como se enumera en la Tabla 12. En estos ejemplos y en el documento WO 2015/113005, se han probado empíricamente muchas mutaciones para determinar el (los) efecto (s) sobre la función efectora de la toxina Shiga de varios polipéptidos efectores de la toxina Shiga y moléculas de reconocimiento celular. La Tabla 12 resume los resultados descritos en los Ejemplos y en el documento WO 2015/113005 donde una sustitución de aminoácidos o combinación de sustituciones de aminoácidos no impidió la exhibición de un nivel potente de la función efectora de la toxina Shiga. La Tabla 12 usa el esquema de numeración de la región del epítipo descrito en el Ejemplo 1 (ver Tabla 7, supra), y enumera cualquier cambio en los epítopos de células B predicho por el software BcePred.

Tabla 12. Sustituciones y combinaciones de sustituciones verificadas empíricamente no impiden la exhibición de una potente función o funciones de efectoras de la toxina Shiga

Posiciones de aminoácido situados de forma nativa				
Región de epítipo	Sustitución(ones)	Predicción de epítipo	Inhibición de ribosoma	citotoxicidad
1		sin cambio	SÍ	SÍ
1		sin cambio	SÍ	SÍ
1		sin cambio	SÍ	SÍ
2		eliminado	SÍ	SÍ
3		eliminado	SÍ	SÍ
3		eliminado	SÍ	SÍ
4		sin cambio	SÍ	SÍ
4		sin cambio	SÍ	SÍ
4		eliminado	SÍ	SÍ
4		eliminado	SÍ	SÍ
4		eliminado	SÍ	SÍ
4		eliminado	SÍ	SÍ
4		sin cambio	SÍ	SÍ

ES 2 847 373 T3

4		eliminado	SÍ	SÍ
4		eliminado	SÍ	SÍ
5		sin cambio	SÍ	SÍ
7		sin cambio	SÍ	SÍ
7		eliminado	SÍ	SÍ
7		eliminado	SÍ	SÍ
7		eliminado	SÍ	SÍ
7		eliminado	SÍ	SÍ
residuo inmuno- génico		eliminado	SÍ	SÍ
4 y 5		eliminado	SÍ	SÍ
4 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
3 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
2, 4 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
4, 5 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
4, 5 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
2, 3, 4, 5 y 6		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 7		eliminado	SÍ	SÍ
4, 5, 6, 7 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
5 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
4 y 8		eliminado		SÍ
3 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
3 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
4 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5 y 7		eliminado		SÍ
3, 4, 5, y 7		eliminado		SÍ
4, 5, 6 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 7		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 6 y 7		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ

3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 6 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 7 y 8		eliminado	SÍ	
3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado		SÍ
1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado		SÍ
1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado		SÍ
1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado		SÍ
1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado		SÍ
1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
1, 3, 4, 5, 6, 7 y 8		eliminado	SÍ	SÍ
3, 4, 5, 6 y 8		eliminado		SÍ
3, 4, 5, 6 y 8		eliminado		SÍ

5 [0773] En las regiones del epítipo 1-5 y 7-8, se han realizado y probado diferentes sustituciones de aminoácidos (véase la Tabla 12). En la región del epítipo n. ° 1 (ver Tabla 7), la lisina localizada de forma nativa en la posición 1 en las Subunidades A maduras de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina. (K1A) y metionina (K1M)). En la región del epítipo n. ° 1, la treonina localizada de forma nativa en la posición 4 en las subunidades A maduras de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (T4I). En la región del epítipo n. ° 1, el aspartato situado de forma nativa en la posición 6 en las subunidades A maduras de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a arginina (D6R). En la región del epítipo n. ° 1, la serina localizada de forma nativa en la posición 8 en las subunidades A maduras de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (S8I). En la región del epítipo n. ° 1, la treonina localizada de forma nativa en la posición 9 en las subunidades A maduras de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (T9I) y a valina (T9V). En la región del epítipo n. ° 1, la lisina localizada de forma nativa en la posición 11 en las subunidades A maduras de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (K11A) y a histidina (K11H). En la región del epítipo n. ° 1, la treonina localizada de forma nativa en la posición 12 en las subunidades A maduras de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a lisina (T12K).

20 [0774] En la región del epítipo # 2 (ver Tabla 7), la serina localizada de forma nativa en la posición 33 en las Subunidades A maduras de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (S33I).

25 [0775] En la región del epítipo n. ° 3 (véase la Tabla 7), la serina localizada de forma nativa en la posición 43 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a asparagina (S43N). En la región del epítipo n. ° 3, la glicina localizada de forma nativa en la posición 44 en la subunidad A madura de la toxina



similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a leucina (G44L). En la región del epítipo n.º 3, la serina localizada de forma nativa en la posición 45 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a valina (S45V) y a isoleucina (S45I). En la región del epítipo n.º 3, la treonina localizada de forma nativa en la posición 45 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 2) fue mutada a valina (T45V) e isoleucina (T45I). En la región del epítipo n.º 3, la glicina localizada de forma nativa en la posición 46 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a prolina (G46P). En la región del epítipo n.º 3, el aspartato situado de forma nativa en la posición 47 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) se transformó en glicina (D47G) y metionina (D47M). En la región del epítipo n.º 3, la asparagina localizada de forma nativa en la posición 48 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a valina (N48V) y a fenilalanina (N48F).

[0776] En la región del epítipo # 4 (véase la Tabla 7), el aspartato situado de forma nativa en la posición 53 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a alanina (D53A), glicina (D53G) y asparagina (D53N). El residuo de D53 fue predicho por el servidor web Epitepia para ser expuesto al solvente y tener un valor de escala de inmunogenicidad de 5 o "alto". En la región del epítipo n.º 4, la valina localizada de forma nativa en la posición 54 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (V54I). En la región del epítipo n.º 4, la arginina localizada de forma nativa en la posición 55 en la subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (R55A), para valina (R55V) y leucina (R55L). En la región del epítipo n.º 4, la glicina localizada de forma nativa en la posición 56 en la subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutaron a prolina (G56P). En la región del epítipo n.º 4, la isoleucina localizada de forma nativa en la posición 57 en la subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a metionina (D57M) y a fenilalanina (D57F). En la región del epítipo n.º 4, el aspartato situado de forma nativa en la posición 58 en la subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutaron a alanina (D58A), para valina (D58V) y fenilalanina (D58F). En la región del epítipo n.º 4, la prolina localizada de forma nativa en la posición 59 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (P59A). En la región del epítipo n.º 4, el glutamato situado de forma nativa en la posición 60 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (E60I), para treonina (E60T) y arginina (E60R). En la región del epítipo n.º 4, el glutamato situado de forma nativa en la posición 61 en la subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutaron a alanina (E61A), para valina (E61V) y leucina (E61L). En la región del epítipo n.º 4, la glicina localizada de forma nativa en la posición 62 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (G62A).

[0777] En la región del epítipo # 5 (véase la Tabla 7), el aspartato situado de forma nativa en la posición 94 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a alanina (D94A). En la región del epítipo n.º 5, la serina localizada de forma nativa en la posición 96 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (S96I). En la región del epítipo n.º 5, la treonina localizada de forma nativa en la posición 104 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a asparagina (T104N). En la región del epítipo n.º 5, la alanina localizada de forma nativa en la posición 105 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a leucina (A105L). En la región del epítipo n.º 5, la treonina localizada de forma nativa en la posición 107 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a prolina (T107P). En la región del epítipo n.º 5, la leucina localizada de forma nativa en la posición 108 en la subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a metionina (L108M). En la región del epítipo n.º 5, la serina localizada de forma nativa en la posición 109 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a valina (S109V). En la región del epítipo n.º 5, la glicina localizada de forma nativa en la posición 110 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (G110A). En la región del epítipo n.º 5, el aspartato situado de forma nativa en la posición 111 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se transformó en treonina (D111T). En la región del epítipo n.º 5, la serina localizada de forma nativa en la posición 112 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a valina (S112V).

[0778] En la región del epítipo n.º 6 (véase la Tabla 7), el aspartato situado de forma nativa en la posición 141 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a alanina (D141A). En la región del epítipo n.º 6, la glicina localizada de forma nativa en la posición 147 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (G147A).

[0779] En la región del epítipo # 7 (véase la Tabla 7), la arginina localizada de forma nativa en la posición 179 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a alanina (R179A). El servidor web Epitepia predijo que este residuo R179 estaría expuesto y que tendría un valor de

inmunogenicidad de 5 o "alto". En la región del epítipo n.º 7 (ver Tabla 7), la treonina localizada de forma nativa en la posición 180 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a glicina (T180G). En la región del epítipo n.º 7 (ver Tabla 7), la treonina localizada de forma nativa en la posición 181 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (T181I). En la región del epítipo n.º 7 (ver Tabla 7), el aspartato situado de forma nativa en la posición 183 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se transformó en alanina. (D183A) y a glicina (D183G). En la región del epítipo n.º 7, el aspartato situado de forma nativa en la posición 184 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a alanina (D184A) o fenilalanina (D184F). En la región del epítipo n.º 7 (ver Tabla 7), la leucina localizada de forma nativa en la posición 185 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a valina (L185V) o aspartato (L185D). En la región del epítipo n.º 7, la serina localizada de forma nativa en la posición 186 en la subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (S186A) y a fenilalanina (S186F). En la región del epítipo n.º 7, la glicina localizada de forma nativa en la posición 187 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (G187A) y a treonina (G187T). En la región del epítipo n.º 7, la arginina localizada de forma nativa en la posición 188 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (R188A) y a leucina (R188L). En la región del epítipo n.º 7, la serina localizada de forma nativa en la posición 189 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (S189A).

[0780] En la región del epítipo # 8 (véase la Tabla 7), la arginina localizada de forma nativa en la posición 248 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) mutado a alanina (R248A). En la región del epítipo n.º 8, la arginina localizada de forma nativa en la posición 251 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (R251A).

[0781] La leucina localizada de forma nativa en la posición 49 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (L49A). El servidor web Epitepia predijo que este residuo de L49 estaría expuesto a solventes y tendría un valor de inmunogenicidad de 4 y está presente en el epítipo de células T n.º 2 (véase la Tabla 7). El glutamato localizado de forma nativa en la posición 198 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a alanina (D198A). El servidor web Epitepia predijo que este residuo D198 estaría expuesto a solventes y que tendría un valor de inmunogenicidad de 5 o "alto". La arginina localizada de forma nativa en la posición 205 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (R205A). El servidor web Epitepia predijo que este residuo R205 estaría expuesto a solventes y tendría un valor de inmunogenicidad de 5 o "alto".

[0782] En los epítopos de células T # 1 a # 6, se han realizado y probado diferentes sustituciones de aminoácidos (ver Tabla 12).

[0783] En el epítipo de células T n.º 1 (véase la Tabla 7), la treonina se localiza de forma nativa en la posición 4 en las subunidades A maduras de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a isoleucina (T4I), el aspartato localizado de forma nativa en la posición 6 en las subunidades A maduras de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a arginina (D6R), la serina localizada de forma nativa en la posición 8 en las Subunidades A maduras de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (S8I), la treonina localizada de forma nativa en la posición 9 en las subunidades A maduras de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (T9I) y a valina (T9V), la lisina localizada de forma nativa en la posición 11 en las Subunidades A maduras de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (K11A) y a histidina (K11H), la treonina localizada de forma nativa en la posición 12 en las subunidades A maduras similar a toxina Shida 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutaron a lisina (T12K), y la serina se ubicó de forma nativa en la posición 33 en las Subunidades A maduras de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (S33I).

[0784] En el epítipo de células T n.º 2 (véase la Tabla 7), la serina localizada de forma nativa en la posición 43 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) se transformó en asparagina (S43N); la glicina localizada de forma nativa en la posición 44 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a leucina (G44L); la serina localizada de forma nativa en la posición 45 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a valina (S45V) y a isoleucina (S45I); la glicina localizada de forma nativa en la posición 46 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a prolina (G46P); el aspartato localizado de forma nativa en la posición 47 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutado a glicina (D47G) y a metionina (D47M); la asparagina localizada de forma nativa en la posición 48 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) fue mutada a valina (N48V) y a fenilalanina (N48F); la fenilalanina localizada de forma nativa en la posición 50 en la Subunidad A

5  
10  
15  
20

madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (F50T); la alanina localizada de forma nativa en la posición 51 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a valina (A51V); el aspartato situado de forma nativa en la posición 53 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (D53A), glicina (D53G) y asparagina (D53N); la valina localizada de forma nativa en la posición 56 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a leucina (V54L); la arginina localizada de forma nativa en la posición 55 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (R55A), a valina (R55V), y a leucina (R55L); la glicina localizada de forma nativa en la posición 56 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a prolina (G56P); la isoleucina localizada de forma nativa en la posición 57 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a metionina (D57M) y a fenilalanina (D57F); el aspartato situado de forma nativa en la posición 58 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (D58A), a valina (D58V), y a fenilalanina (D58F); la prolina localizada de forma nativa en la posición 59 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (P59A); el glutamato localizado de forma nativa en la posición 60 en la subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (E60I), a treonina (E60T), y a arginina (E60R); el glutamato situado de forma nativa en la posición 61 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutaron a alanina (E61A), a valina (E61V), y a leucina (E61L); la glicina localizada de forma nativa en la posición 62 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (G62A).

25

[0785] En el epítipo de células T # 3 (véase la Tabla 7), el aspartato está situado de forma nativa en la posición 94 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (D94A), y la serina localizada de forma nativa en la posición 96 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (S96I).

30

[0786] En el epítipo de células T # 4 (véase la Tabla 7), la glicina localizada de forma nativa en la posición 147 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutado a alanina (G147A).

35  
40

[0787] En el epítipo de células T n.º 5 (véase la Tabla 7), la arginina se encuentra de forma nativa en la posición 179 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (R179A), la treonina localizada de forma nativa en la posición 180 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a glicina (T180G), la treonina localizada de forma nativa en la posición 181 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a isoleucina (T181I), y el aspartato localizado de forma nativa en la posición 183 en la Subunidad A madura de la toxina similar a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (D183A) y a glicina (D183G).

45

[0788] En el epítipo de células T # 6 (ver Tabla 7), la cisteína localizada de forma nativa en la posición 242 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a serina (C242S), la arginina localizada de forma nativa en la posición 248 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) fue mutada a alanina (R248A), y la arginina localizada de forma nativa en la posición 251 en la Subunidad A madura de la toxina tipo Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) y la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2) se mutaron a alanina (R251A).

50

[0789] Además, el truncamiento del extremo carboxi terminal de SLT-1A a los aminoácidos 1-251 de la SEQ ID NO: 1 eliminó las dos últimas regiones del epítipo (Tabla 7, # 9 y # 10), el último epítipo de células T CD4 + (Tabla 6, # 7), y el epítipo de células B discontinuo de mayor puntuación predicho por ElliPro (289-293). Además, el truncamiento en la posición 251 interrumpe el epítipo de células T # 6 y la región del epítipo # 8 (Tabla 7).

55  
60

[0790] Un ejemplo de polipéptido efector de toxina Shiga desinmunizado de este ejemplo es SLT-1A-combinación22 (SEQ ID NO: 28), que tiene siete sustituciones de residuos de aminoácidos con respecto a la toxina 1 de tipo salvaje tipo Shiga. Se predijo que una subunidad (SEQ ID NO: 1) y todas estas sustituciones interrumpían los epítipos endógenos. De acuerdo con los marcadores en la Tabla 8, el polipéptido efector de toxina Shiga SLT-1A-combinación22 comprende una región 4 de epítipo que interrumpe la sustitución; una sustitución que interrumpe la región 5 del epítipo; una sustitución que interrumpe la región del epítipo 6; una sustitución que interrumpe la región del epítipo 7; sustituciones que alteran la región del epítipo 8; regiones epítipo 8, 9 y 10 alteradas por truncamiento; y sustituciones que alteran el sitio de escisión por furina en el extremo carboxi terminal de la región derivada del fragmento A1. Además, SLT-1A-combinación22 comprende una sustitución que interrumpe el epítipo de células T # 2, una sustitución que interrumpe el epítipo de células T # 4, las sustituciones que interrumpen el epítipo # 6 y los epítipos de células T # 6 y # 7 alterados por truncamiento.

65

E. Pruebas para reducir las antigenicidades de los ejemplos de polipéptidos efectores de toxinas Shiga SLT-1A-combinación (n) usando ensayos ELISA y Western Blot

[0791] Se pueden usar procedimientos de rutina para evaluar las antigenicidades relativas de los polipéptidos efectores de toxina Shiga en el contexto de moléculas que se dirigen a las células (véase, por ejemplo, WO 2015/113005; WO 2015/113007). Las antigenicidades de las moléculas de ejemplo de reconocimiento celular que comprenden ciertos polipéptidos efectores de la toxina Shiga combinados, desimmunizados, resistentes a la escisión de la proteasa, combinación SLT-1A (n) se evaluaron mediante transferencias Western y ELISA utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen con alta afinidad por el fragmento de toxina A1 tipo Shiga de tipo salvaje (SLT-1A1). La molécula de reconocimiento celular SLT-1A-FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34) se utilizó como molécula de referencia.

[0792] Los análisis de Western utilizados en este documento determinaron la antigenicidad relativa en condiciones desnaturizantes, mientras que los análisis ELISA utilizados en este documento midieron la antigenicidad relativa en condiciones de plegamiento de proteínas nativas.

[0793] Para los análisis occidentales, se probaron las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo que comprenden los polipéptidos efectores de toxina Shiga SLT-1A-combinación7, SLT-1A-combinación10 o SLT-1A-combinación14 y se compararon con los resultados para la molécula de referencia SLT-1A-FR::scFv-1. Las muestras de las moléculas mencionadas anteriormente se cargaron en cantidades iguales para replicar geles de poliacrilamida SDS al 4-20% (Lonza, Basilea, CH) y se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes. Los geles resultantes se analizaron mediante tinción de Coomassie o se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) utilizando el sistema iBlot® (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) De acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las membranas resultantes se sondearon en condiciones estándar utilizando los siguientes anticuerpos:  $\alpha$ -Stx monoclonal de ratón (mAb1) (BEI NR-867 BEI Resources, Manassas, VA, EE. UU.; Reactivo cruzado con la subunidad de toxina 1 A tipo Shiga), policlonal de conejo anticuerpo  $\alpha$ -SLT-1A (pAb1) (Harlan Laboratories, Inc. Indianápolis, IN, EE. UU., producción de anticuerpos personalizados contra el SLT-1A1 de tipo salvaje y anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -SLT-1A (pAb2) (Genscript, Piscataway, NJ, US, producción de anticuerpos personalizados) que se generó contra péptidos del fragmento de la toxina Shiga A1 de tipo salvaje: RGIDPEEGRFNN y HGQDSVRVGR. La secuencia de péptidos RGIDPEEGRFNN se encuentra en los aminoácidos 55-66 y la secuencia de péptidos HGQDSVRVGR se encuentra en 214- 223 en SLT-1A y StxA. Los anticuerpos unidos a la membrana se detectaron usando condiciones estándar y, cuando fue apropiado, usando anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP de cabra anti-conejo o HRP de cabra anti-ratón, Thermo Scientific, Rockford, IL, EE. UU.) La figura 13 muestra Western se borra con los carriles de los geles y/o membranas numerados y la leyenda de la figura que indica con la misma numeración respectiva qué regiones de polipéptido efector de toxina Shiga estaban presentes en la molécula de reconocimiento celular cargada en cada carril. Los carriles teñidos con Coomassie se muestran como controles de carga de muestra.

[0794] La Figura 13 muestra que, en condiciones de desnaturización, las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación7::scFv-1, SLT-1A-combinación10::scFv-1 y SLT-1A-combinación14::scFv-1 exhiben antigenicidades disminuidas en comparación con SLT-1A-FR::scFv-1 en este ensayo. Estos resultados demuestran que SLT-1A-combinación7, SLT-1A-combinación10 y SLT-1A-combinación14 tienen antigenicidades disminuidas en comparación con SLT-1A-FR, o por inferencia a SLT-1A-WT, cuando están unidas de la misma manera al mismo dominio de orientación (scFv-1) utilizando el mismo enlazador. Además, los resultados mostrados en la Figura 13 sugieren que SLT-1A-combinación7 ha reducido la antigenicidad relativa en comparación con SLT-1A-combinación10 y SLT-1A-combinación14 en este ensayo en las condiciones probadas.

[0795] Se usó un ELISA estándar para medir la capacidad del mAb1  $\alpha$ -SLT-1A para reconocer varios polipéptidos efectores de la toxina Shiga desimmunizados, cada uno con múltiples regiones del epítipo alteradas, en el contexto de una molécula de reconocimiento celular. La capacidad de cada molécula de reconocimiento celular probada para unirse a la biomolécula objetivo de su región de unión a scFv se utilizó en el ensayo. Los pocillos de las placas Nunc MaxiSorp® en solución salina tamponada con fosfato (1X PBS) (Hyclone Brand, Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) Se revistieron con biomolécula humana recombinante de la región de unión (scFv-1). Las placas se incubaron durante la noche a 4 ° C. Los pocillos se lavaron con 1X PBS Tween-20 al 0,05% (PBS-T), y la unión no específica se bloqueó incubando los pocillos con leche al 3% en PBS-T durante una hora a temperatura ambiente. Se agregaron a los pocillos moléculas de ejemplo dirigidas a células, donde ciertos pozos recibieron solo una molécula de reconocimiento celular que comprende solo un polipéptido SLT-1A-combinación (n): SLT-1A-combinación7 SLT-1A-combinación7, combinado, desimmunizado, efector de la toxina Shiga. : scFv-1, SLT-1A-combinación10::scFv-1 o SLT-1A-combinación14::scFv-1. Además, la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-FR::scFv-1 se agregó a ciertos pocillos como molécula de referencia. Todas las moléculas de reconocimiento celular se agregaron a los pocillos a una concentración determinada por encima de la unión máxima (Bmáx) determinada previamente con un ELISA usando proteína L conjugada con HRP para detectar SLT-1A-FR::scFv-1, permitiendo así El 100% de las biomoléculas diana disponibles se unirán a la muestra de molécula de reconocimiento celular, que está en exceso. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora para permitir que la molécula de reconocimiento celular se una a la biomolécula objetivo en condiciones no desnaturizantes. Los pocillos se lavaron

con PBS-T y a continuación se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón anti-SxtA conjugado con HRP (anti-SLT-1A mAb1-HRP) o anticuerpo policlonal de conejo  $\alpha$ -SLT-1A conjugado con HRP (anti-SLT-1A pAb2 -HRP) o proteína L-HRP (que se une a scFv-1 y se usó como control de carga) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron en PBS-T y a continuación se incubaron con Pierce TMB Ultra (Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, EE. UU.). Las reacciones se detuvieron con ácido clorhídrico (HCl) 250 mM. La actividad de HRP se detectó en los pocillos agregando un sustrato cromógeno de HRP y a continuación detectando la emisión de luz, resultante de la quimioluminiscencia, utilizando un dispositivo de lectura de placa que mide la absorbancia (Abs) de la luz ajustada a la longitud de onda de 450 nanómetros (nm).

[0796] Los valores de absorbancia medidos se corrigieron para el fondo restando los valores de absorbancia para pozos recubiertos y bloqueados incubados con solo PBS en lugar de cualquier muestra de molécula de reconocimiento celular. Para normalizar las señales de los tres anticuerpos de detección diferentes, las señales de SLT-1A-FR::scFv1 se establecieron al 100%, y las señales relativas como un porcentaje de este control se determinaron para cada muestra de molécula de reconocimiento celular probada por el cálculo (señal de Abs de la muestra/señal de Abs promedio del control) x 100. Los resultados de ELISA se muestran en la Figura 14.

[0797] La Figura 14 muestra que, en condiciones nativas, las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44), SLT-1A-combinación10::scFv-1 (SEQ ID NO : 47), o SLT-1A-combinación14::scFv-1 (SEQ ID NO: 50) exhiben antigenidades disminuidas en comparación con SLT-1A-FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34). Estos resultados demuestran que SLT-1A-combinación7, SLT-1A-combinación10 y SLT-1A-combinación14 exhiben antigenidades disminuidas en comparación con SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5), o por inferencia o SLT-1A1-WT (SEQ ID NO: 4), cuando se vincula de la misma manera al mismo dominio de orientación (scFv-1) utilizando el mismo enlazador. Además, los resultados que se muestran en la Figura 14 sugieren que SLT-1A-combinación7 y SLT-1A-combinación14 tienen antigenidades relativas reducidas en comparación con SLT-1A-combinación10 en las condiciones nativas de este ensayo ELISA.

#### F. Ensayo de la desinmunización de células T CD4 + de los ejemplos de polipéptidos efectores de toxina Shiga SLT-1A-combinación (n)

[0798] Las alteraciones en las regiones predichas del epítipo de células T CD4 + se prueban para detectar reducciones en la inmunogenicidad de células T CD4 + usando ensayos de proliferación de células T CD4 + humanas en presencia de polipéptidos administrados exógenamente y ensayos de estimulación dendrítica de células T CD4 + humanas en la presencia de monocitos humanos tratados con polipéptidos administrados.

[0799] Los ensayos de proliferación de células T conocidos por el experto se usan para probar la efectividad de la desinmunización del epítipo de células T CD4 + de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n). El ensayo de proliferación de células T de este ejemplo implica el marcado de células T CD4 + y a continuación medir los cambios en la proliferación usando procedimientos de citometría de flujo en respuesta a la administración de diferentes péptidos derivados de una combinación de polipéptido efector de toxina Shiga (n) o una referencia molécula, tal como, p. ej., un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje, SLT-1A-FR, y/o una molécula de reconocimiento celular relacionada que comprende lo mencionado anteriormente.

[0800] Una serie de péptidos superpuestos derivados de la molécula elegida se sintetizan y prueban en el ensayo de proliferación de células T CD4 + CFSE (ProlImmune Inc., Sarasota, FL, EE. UU.). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) empobrecidas en células T CD8 + humanas marcadas con CFSE se cultivan con 5  $\mu$ M de cada péptido de interés durante siete días en seis pocillos replicados. Cada placa de ensayo incluye un conjunto de pocillos de control no tratados. El ensayo también incorpora controles de antígeno de referencia, que comprenden péptidos sintéticos para antígenos o agretopes conocidos de MHC de clase II.

[0801] + de células T CD8 El agotada, PBMCs que proliferan en respuesta a un péptido administrado se muestran una reducción en la intensidad de fluorescencia CFSE como se mide directamente por citometría de flujo. Para un análisis de células T ingenuo, el porcentaje de estimulación por encima del fondo se determina para cada muestra estimulada, mediante la comparación con los resultados de una muestra no estimulada, tal como clasificando con respecto a la señal fluorescente, como negativa, tenue o alta. Los recuentos de la población tenue de células T CD4 + CFSE en cada muestra se expresan como una proporción de la población total de células T CD4 +. Los valores de replicación se usan para calcular el porcentaje de estimulación por encima del fondo (proporción de células débiles CFSE de células T CD4 + con estimulación de antígeno, menos la proporción de células atenuadas CFSE de células T CD4 + sin estimulación de antígeno). La media y el error estándar de la media se calculan a partir de los valores replicados. Un resultado se considera "positivo" si el porcentaje de estimulación sobre el fondo es mayor que 0.5% y también mayor que el doble del error estándar sobre el fondo. Para permitir la comparación de péptidos, se calcula un índice de respuesta. Este índice se basa en multiplicar la magnitud de la respuesta (Porcentaje de estimulación sobre el fondo) para cada péptido por el número de donantes que responden (Porcentaje de antigenicidad) para cada péptido.

G. Determinación de las inmunogenicidades de células T CD4 + relativas de los ejemplos de polipéptidos efectores

de toxina Shiga SLT-1A-combinación (n)

[0802] La inmunogenicidad relativa de las células T CD4 + de las moléculas de la invención se determina usando el siguiente ensayo de proliferación de células T de células dendríticas (DC). Este ensayo de células T DC mide las respuestas de células T CD4 + a polipéptidos o proteínas administrados exógenamente. El ensayo de células T de DC se realiza usando el servicio de ensayo DC-T de ProImmune para determinar los niveles relativos de inmunogenicidad dirigida por células T CD4 + entre proteínas y moléculas de reconocimiento celular de la presente invención en comparación con las moléculas de referencia. El ensayo de células T de DC de este ejemplo implica probar células dendríticas humanas para la presentación de antígenos de péptidos derivados de las muestras administradas de polipéptidos, proteínas o moléculas de reconocimiento celular.

[0803] Brevemente, se usan tejidos de donantes humanos sanos para aislar muestras tipificadas en base a la tipificación de tejidos de MHC de clase II de alta resolución. Se utiliza una cohorte de 20, 40 o 50 donantes. Primero, los monocitos obtenidos de PBMC de donantes humanos se cultivan en un medio definido para generar células dendríticas inmaduras. A continuación, las células dendríticas inmaduras se estimulan con un antígeno de control bien definido y se inducen a un fenotipo más maduro mediante cultivo adicional en un medio definido. A continuación, las PBMC de donante empobrecido de células T CD8 + de la misma muestra de donante humano se marcan con CFSE. Las PBMC marcadas con CFSE, células T CD8 + empobrecidas se cultivan a continuación con las células dendríticas cebadas con antígeno durante siete días para permitir la estimulación de células dendríticas CD4 +, después de lo cual se prueban ocho réplicas para cada muestra. Como controles negativos, cada serie de cultivos de células dendríticas también incluye un conjunto de células dendríticas no tratadas. Para un control positivo, el ensayo incorpora dos antígenos de referencia bien definidos, cada uno de los cuales comprende una proteína de longitud completa.

[0804] Para evaluar la inmunogenicidad basada en células dendríticas, la frecuencia de las respuestas de las células donantes se analiza en toda la cohorte del estudio. Las respuestas positivas en el ensayo se consideran indicativas de una posible respuesta in vivo de células T CD4 +. Una respuesta positiva, medida como un porcentaje de estimulación por encima del fondo, se define como porcentajes superiores al 0,5 por ciento (%) en dos o más muestras de donantes independientes. La fuerza de las respuestas positivas de las células del donante se determina tomando el porcentaje de estimulación promedio por encima del fondo obtenido entre los donantes aceptados para cada muestra. Un índice de respuesta se calcula multiplicando el valor de la fuerza de respuesta por la frecuencia de los donantes que responden para determinar los niveles de inmunogenicidad de células T CD4 + para cada muestra. Además, se determina un índice de respuesta, que representa la inmunogenicidad relativa de células T CD4 + comparando los resultados de dos muestras, una que involucra un combinación de polipéptidos efectores de toxinas Shiga SLT-1A (n) y una segunda variante que es una molécula relacionada que carece de una o más alteraciones predichas de un epítipo de células T CD4 + y/o región de epítipo como molécula de referencia.

H. Ensayos para la reducción de las inmunogenicidades de las moléculas de ejemplo de reconocimiento celular que comprenden los polipéptidos efectores de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n)

[0805] Los ratones se utilizaron para investigar el potencial inmunogénico de ciertas moléculas de ejemplo de la presente invención. Las inmunogenicidades relativas de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo se determinaron usando un ensayo para las respuestas de anticuerpos in vivo a las moléculas de reconocimiento celular después de repetidas administraciones parenterales durante períodos de muchas semanas (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/113005). Se usó un ELISA en solución para determinar la cantidad relativa de anticuerpos murinos en suero que eran específicos para diferentes moléculas de reconocimiento celular. Este ensayo de inmunogenicidad implica el uso de ratones que son indicativos de las inmunogenicidades relativas de las moléculas en mamíferos en general.

[0806] Este ensayo se usó para determinar la inmunogenicidad relativa de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo que comprenden SLT-1A-combinación (n)::scFv- (n) en comparación con la molécula SLT-1A menos inmunizada y de reconocimiento celular -FR::scFv (n) o a la molécula de referencia scFv-3::SLT-1A-WT (SEQ ID NO: 33). La molécula de referencia scFv-3::SLT-1A-WT se construyó en la orientación de fusión inversa de aminocarboxilo de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención probadas en el ensayo de inmunogenicidad relativa, y el componente del polipéptido efector de la toxina Shiga de scFv-3::SLT-1A-WT consistió en un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje (SEQ ID NO: 4), que representa un polipéptido efector de toxina Shiga "no inmunizado".

[0807] Se llevaron a cabo cuatro estudios de ratones diferentes en los que los ratones BALB/co C57BL/6 se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento que constaban de seis ratones por grupo y donde a los ratones en diferentes grupos de tratamiento se les administraron diferentes moléculas de reconocimiento celular. Primero, se recogieron muestras de suero de cada ratón antes de la exposición a una molécula de reconocimiento celular. A continuación, a cada ratón en un grupo de tratamiento se le administró 0,25 miligramos de la molécula de muestra por kilogramo de peso corporal (mg/kg) por dosis de la molécula de reconocimiento celular de muestra por inyección intraperitoneal tres veces por semana durante dos semanas. Después de una semana sin la administración de

ninguna muestra, se administraron inyecciones intraperitoneales de 0.25 mg/kg por dosis de la molécula objetivo de células de la muestra tres veces por semana durante dos semanas adicionales, lo que resultó en un total de 12 dosis de molécula objetivo de células durante un intervalo de cinco semanas. Para todos los estudios, las moléculas administradas SLT-1A-combinación1::scFv-1 (SEQ ID NO: 43), SLT-1A-combinación7::scFv-1 (SEQ ID NO: 44), SLT-1A-combinación10::scFv-1 (SEQ ID NO: 47), SLT-1A-combinación10::scFv-2 (SEQ ID NO: 61), SLT-1A-combinación12::scFv-1 (SEQ ID NO: 49), SLT-1A-combinación15::scFv-1 (SEQ ID NO: 51), SLT-1A-combinación16::scFv-1 (SEQ ID NO: 52), SLT-1A-combinación19::scFv-1 (SEQ ID NO: 55), SLT-1A-combinación22::scFv-2 (SEQ ID NO: 63) y las moléculas de referencia SLT-1A-FR::scFv-1 (SEQ ID NO: 34) y SLT-1A-FR::scFv-2 (SEQ ID NO: 35) fueron bien toleradas, dando como resultado efectos nulos o mínimos en el peso corporal y sin signos clínicos. Durante y después del intervalo de administración de cinco semanas, se recogieron sueros de todos los ratones para observar anticuerpos dirigidos a las moléculas administradas de reconocimiento celular usando ELISA en solución. Los estudios con ratones se realizaron en Charles River Laboratories en Piedmont, Carolina del Norte, EE. UU. Los resultados de estos estudios se muestran en las Tablas 13-16 y las Figuras 15-16.

[0808] Los ELISA en solución para detectar anticuerpos que reconocen las moléculas de reconocimiento celular administradas fueron específicos para la región de unión scFv- (n) de la molécula de reconocimiento celular que se ensayó y realizó de la siguiente manera. Para cada molécula de reconocimiento celular y su respectivo grupo de tratamiento con ratones, se realizó un ensayo ELISA diferente pero usando la misma configuración general del ensayo ELISA en solución. Para cada molécula de reconocimiento celular y su respectivo grupo de tratamiento con ratones, la configuración del ensayo ELISA en solución involucró solo la biomolécula objetivo apropiada del scFv- (n) de la molécula de reconocimiento celular de ese grupo. Para todos los ensayos ELISA en solución, los pocillos de la placa ELISA se revistieron con una biomolécula diana de la región de unión a la dirección celular scFv- (n). La misma molécula de reconocimiento celular utilizada para las inyecciones en un grupo de tratamiento con ratones se incubó durante la noche a 4 ° C en solución con el suero recogido de un solo ratón de ese grupo, y a continuación se formaron los complejos (por ejemplo, los complejos que comprenden la molécula de reconocimiento celular y anticuerpos presentes en el suero) fueron capturados usando los pozos de placa de ELISA recubiertos. Los complejos inmunes capturados que comprenden moléculas de inmunoglobulina G murinas (IgG) se detectaron usando un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante. La actividad de HRP se detectó en los pocillos agregando un sustrato cromógeno de HRP y a continuación detectando la emisión de luz como resultado de la quimioluminiscencia. La reacción se detuvo mediante la adición de HCl, y la actividad de HRP o "señal de ELISA" se midió a 450 nM usando un lector de placa. Los valores de la señal ELISA se calcularon como valores de absorbancia (Abs 450 nM) después de restar la señal de fondo medida a partir de los pocillos de control negativo "sin suero". El suero se diluyó para permitir lecturas del valor de absorbancia por debajo del nivel de saturación para el ensayo, y la relación de dilución fue la misma para todos los ratones en todos los grupos de tratamiento medidos en un día dado. Para la configuración general de estos ensayos ELISA en solución, los valores de señal ELISA más grandes indican la presencia de más anticuerpos IgG murinos que reconocen la molécula de reconocimiento celular administrada o, en otras palabras, una mayor inmunogenicidad.

[0809] En base a estos ensayos ELISA en solución, ninguno de los ratones en ningún grupo de tratamiento de los cuatro estudios tenía anticuerpos séricos preformados que reconocen las moléculas de reconocimiento celular analizadas antes de la exposición mediante inyección. Por lo tanto, cualquier detección posterior a la administración de anticuerpos IgG anti "molécula de reconocimiento celular" en los sueros de los ratones de estos estudios que utilizan el ensayo ELISA en solución representa de novo, la producción de anticuerpos inducida después de la administración de una molécula de reconocimiento celular.

[0810] Las respuestas de anticuerpos IgG murinos a las moléculas de reconocimiento celular administradas se midieron en los cuatro estudios en diferentes puntos temporales usando los ensayos ELISA en solución apropiados, y los resultados se informan en las Tablas 13-16 y Figuras 15-16. En cada punto de tiempo, las muestras de suero se diluyeron de manera que los valores de la señal ELISA permanecieron dentro del rango dinámico del ensayo. Para un solo punto de tiempo en un estudio individual, todas las muestras de suero se diluyeron de forma idéntica. Se calcularon los valores promedio de absorbancia de ELISA para cada grupo de tratamiento con ratón en puntos de tiempo de recolección de suero individual ("señal de ELISA promedio"). Al realizar estos estudios de inmunogenicidad relativa, la misma molécula de reconocimiento celular inyectada en los ratones de un grupo de tratamiento particular se usó en el ensayo ELISA para capturar anticuerpos de suero de sueros recolectados solo de ratones de ese mismo grupo. En otras palabras, se capturaron y detectaron anticuerpos IgG anti-"molécula de reconocimiento celular" presentes en los sueros de ratones administrados SLT-1A-FR::scFv-1 (el grupo de referencia SLT-1A-FR::scFv-1) en un ensayo ELISA diseñado específicamente y solo con SLT-1A-FR::scFv-1 y, de manera similar, anticuerpos IgG anti "molécula de reconocimiento celular" presentes en los sueros de ratones administrados SLT-1A-combinación7::scFv-1 (por ejemplo, el grupo SLT-1A-combinación7::scFv-1) fueron capturados y detectados usando un ensayo ELISA en solución diseñado específicamente y solo con SLT-1A-combinación7::scFv-1.

[0811] Se calcularon los valores medios de la señal de ELISA para cada grupo de tratamiento con ratón en puntos de tiempo de recolección de suero individual, y a continuación se calculó la inmunogenicidad relativa para cada

grupo en cada punto de tiempo en relación con el valor de Absorbancia de ELISA promedio en el mismo respectivo punto temporal para el grupo de referencia tratado con la molécula de referencia celular dirigida como se describió anteriormente. La inmunogenicidad relativa de cada molécula de reconocimiento celular de ejemplo, probada (SLT-1A-combinación7::scFv- (n)) en un estudio dado en un determinado momento en comparación con la inmunogenicidad de una molécula de referencia (por ejemplo, SLT-1A-FR::scFv- (n) o scFv-3::SLT-1A-WT) se calculó utilizando la fórmula: (señal de ELISA de la molécula de reconocimiento celular - señal de ELISA promedio de control "sin suero")/(señal ELISA promedio de la molécula de referencia - señal ELISA promedio de control "sin suero") x 100. Para crear las Figuras 15-16, el porcentaje de la señal ELISA de la molécula de referencia para cada grupo de tratamiento con ratón se graficó en el Y- eje, y el día de la recolección de suero fue graficado en el eje X. Para medir las respuestas de IgG de mamíferos a cada molécula de reconocimiento celular, la señal ELISA promedio ("señal promedio") y el porcentaje de la señal promedio de la molécula de referencia SLT-1A-FR::scFv- (n) ("porcentaje de referencia ") se calcularon para cada grupo de tratamiento con ratones (Tablas 13-16).

[0812] Los resultados de los ensayos de inmunogenicidad relativa del primer estudio en ratones se presentan en la Figura 15-panel A y en la Tabla 13. El término "N/A" se usó para indicar "no aplicable" porque los cálculos en el día 1 implicaron suero de tratamiento con valores de señal en ELISA de cero.

**Tabla 13.** Inmunogenicidades relativas de la molécula de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación7::scFv-1 en comparación con SLT-1A-FR::scFv-1

Día de recogida del suero	SLT-1A-combinación7::scFv-1		SLT-1A-FR::scFv-1 de referencia	
	señal ELISA prom.	porcentaje de referencia	señal ELISA prom.	porcentaje de referencia
1	0	N/A	0	100
15	0,02	3,90%	0,49	100
22	0,10	11,20%	0,87	100
29	0,20	27,30%	0,73	100
36	0,33	35,60%	0,93	100
43	0,20	24,60%	0,80	100
50	0,19	26,30%	0,73	100

[0813] Los resultados del primer estudio de ratón con inmunogenicidad relativa fueron que la molécula de ejemplo de reconocimiento celular SLT-1A-combinación7::scFv-1 exhibió una inmunogenicidad reducida en comparación con la molécula SLT-1A de referencia de reconocimiento celular FR::scFv-1 en todos los puntos de tiempo. Los valores promedio de absorbancia de ELISA para el grupo de tratamiento SLT-1A-combinación7::scFv-1 fueron más bajos que para el grupo de tratamiento SLT-1A-FR::scFv-1 en todos los puntos de tiempo después del día 1 (el suero se recogió antes tratamiento en el día 1). Para las moléculas de reconocimiento celular probadas, las respuestas de IgG anti "molécula de reconocimiento celular" se observaron por primera vez el día 15 (3 días después de la administración de la sexta dosis) y, a continuación, se observaron respuestas de IgG murina en todo momento posterior. puntos: Día 22 (10 días después de la administración de la sexta dosis, antes de la administración de la 7<sup>a</sup> dosis), Día 29 (3 días después de la administración de la novena dosis antes de la administración de la 10<sup>a</sup> dosis), Día 36 (3 días después de la administración de la última dosis), el día 43 (10 días después de la administración de la 11<sup>a</sup> dosis), y el día 50 (17 días después de la administración de la última dosis) (Figura 15-panel A; Tabla 13) . Los datos en la Tabla 13 mostraron que la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación7::scFv-1 que comprende el combinación7 de polipéptido efector de toxina Shiga desimmunizado y resistente a la escisión por furina tenía inmunogenicidad reducida en comparación con la molécula de reconocimiento celular SLT -1A-FR::scFv-1 que comprende un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje. Estos resultados sugieren que las moléculas que comprenden solo polipéptidos efectores de la toxina Shiga que consisten en la combinación de andamio de polipéptido efector de la toxina Shiga combinada, desimmunizada, resistente a la escisión por la proteasa, muestran una inmunogenicidad reducida en comparación con las moléculas que comprenden un polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende (1) un fragmento A1 de toxina similar a Shiga de tipo salvaje o (2) el polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión por furina SLT-1A-FR.

[0814] Los resultados de los ensayos de inmunogenicidad relativa del segundo estudio con ratones se muestran en la Figura 15-panel B y en la Tabla 14.



**Tabla 14.** Inmunogenicidades relativas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga desinmunizados, resistentes a la escisión por proteasa

Día de recogida del suero	SLT-1A-combinación 10::scFV-1		SLT-1A-combinación 16::scFV-1		SLT-1A-combinación 19::scFV-1		SLT-1A-FR::scFV-1 de referencia
	señal prom.	porcentaje de ref.	señal prom.	porcentaje de ref.	señal prom.	porcentaje de ref.	señal prom.
1	0	N/A	0	N/A	0	N/A	0
15	0,36	19,2	0,26	13,5	1,21	63,7	1,9
22	0,44	24,3	0,44	24,4	1,29	71,2	1,81
29	0,27	19,5	0,71	51,5	1,21	87,2	1,38
36	0,59	38,4	1,10	71,2	1,46	94,6	1,55
40	0,63	43,3	1,38	71,5	2,06	106,8	1,93

5 [0815] Los resultados del segundo estudio de inmunogenicidad relativa en ratones fueron que las moléculas de ejemplo dirigidas a células probadas (SLT-1A-combinación10::scFV-1, SLT-1A-combinación16::scFV-1 y SLT-1A-combinación19::scFV-1) exhibió inmunogenicidades reducidas en comparación con la molécula de referencia celular dirigida SLT-1A-FR::scFv-1 en todos los puntos de tiempo hasta el día 36 (Figura 15-panel B; Tabla 14) . Para las moléculas de reconocimiento celular probadas, las respuestas de IgG anti "molécula de reconocimiento celular" se observaron por primera vez el día 15 (3 días después de la administración de la sexta dosis) y, a continuación, se observaron respuestas de IgG murina en todos los puntos posteriores: Día 22 (10 días después de la administración de la sexta dosis, antes de la administración de la 7<sup>a</sup> dosis), Día 29 (3 días después de la administración de la novena dosis antes de la administración de la 10<sup>a</sup> dosis), Día 36 (3 días después de la administración de la última dosis) y el día 40 (7 días después de la administración de la última dosis) (Figura 15-panel B; Tabla 14). Tanto en el día 15 como en el día 22, ratones en el grupo a los que se administró la molécula de reconocimiento celular de referencia SLT-1A-FR::scFv-1 exhibieron mayores magnitudes de respuestas de anticuerpos IgG totales como se muestra por la señal de ELISA que los ratones en los grupos administrado a modo de ejemplo de moléculas de reconocimiento celular que comprenden los andamios efectores de toxina Shiga desinmunizados, resistentes a la escisión de proteasa (SLT-1A-combinación10, SLT-1A-combinación16 y SLT-1A-combinación19) (Figura 15; Tabla 20 14). En los días 29, 36 y 40, los porcentajes de la señal ELISA de referencia promedio de los valores de la señal ELISA promedio para los grupos administrados SLT-1A-combinación16::scFv-1 y SLT-1A-combinación19::scFv-1 fueron más altos que para el grupo administrado con SLT-1A-combinación11::scFv-1. En todos los puntos de tiempo, el porcentaje de la señal ELISA de referencia promedio de los valores promedio de la señal ELISA para el grupo SLT-1A-combinación19::scFv-1 fue mayor que el porcentaje de los valores promedio de la señal ELISA para el grupo administrado con SLT-1A-combinación10::scFv-1 o SLT-1A-combinación16::scFv-1.

[0816] Los resultados de los ensayos de inmunogenicidad relativa del tercer estudio con ratones se muestran en la Tabla 15 y la Figura 15-panel C.

30 **Tabla 15.** Inmunogenicidades relativas de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo comparadas con las moléculas de referencia y entre sí

Día de recogida del suero	SLT-1A-combinación 10::scFV-2				scFv-3::SLT-1A-WT de referencia 1	SLT-1A-FR::scFv-2 de referencia 2
	señal prom. ELISA	porcentaje de scFv-3::SLT-1A-WT de referencia 1	porcentaje de SLT-1A-FR::scFv-2 de referencia 2	señal prom. ELISA	señal prom. ELISA	
1	0	N/A	N/A	0	0	
15	0,11	7,4%	4,9%	1,49	2,25	
22	0,27	12,3%	9,6%	2,20	2,81	
29	1,28	40,6%	35,2%	3,15	3,64	
SLT-1A-combinación 22::scFV-2						
Día de recogida del suero	señal prom. ELISA	porcentaje de scFv-3::SLT-1A de referencia 1	SLT-1A-FR::scFv-2 de referencia 2	señal prom. ELISA de referencia 1	señal prom. ELISA de referencia 2	
1	0	N/A	N/A	0	0	
15	0,60	40,3%	26,7%	1,49	2,25	
22	1,13	51,4%	40,2%	2,20	2,81	
29	2,73	86,7%	75,0%	3,15	3,64	

SLT-1A-combinación 10::scFV-2				SLT-1A-combinación 22::scFV-2 de referencia 3	
Día de recogida del suero	señal prom. ELISA	porcentaje de SLT-1A-combinación 22::scFV-2 de referencia 3		señal prom. ELISA	
1	0	N/A		0	
15	0,11	18,3%		0,60	
22	0,27	23,9%		1,13	
29	1,28	36,9%		2,73	

[0817] Los valores de absorbancia ELISA promedio para los grupos de tratamiento SLT-1A-combinación10::scFv-2 y SLT-1A-combinación22::scFv-2 fueron más bajos que para los grupos de tratamiento SLT-1A-FR::scFv-2 y scFv - 3::SLT-1A-WT grupos de tratamiento en todos los puntos de tiempo después del día 1 hasta el día 29. Los datos en la Tabla 15 mostraron que las moléculas de reconocimiento celular SLT-1A-combinación10::scFv-2 y SLT-1A - combinación22::scFv-2, cada uno de los cuales comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga desimmunizado, resistente a la escisión por furina, exhibió inmunogenicidades reducidas en comparación con la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-FR::scFv2 y el tipo salvaje SLT-1 A1 fragmento en el contexto de un scFv diferente (scFv-3) en la orientación inversa de fusión de carboxi-amino. Estos resultados sugieren que las moléculas de reconocimiento celular cuya región del polipéptido efector de la toxina Shiga consiste en la combinación 10 o combinación 22 de estructura combinada de polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por la proteasa muestran inmunogenicidades reducidas en comparación con las moléculas de reconocimiento celular cuyo efector de la toxina Shiga la región del polipéptido consiste en (1) un polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje o (2) el polipéptido efector de toxina Shiga resistente a la escisión por furina SLT-1A-FR.

[0818] Los resultados de los ensayos de inmunogenicidad relativa del cuarto estudio con ratones se muestran en la Figura 16 y la Tabla 16.

**Tabla 16.** Inmunogenicidades relativas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo comparadas con SLT-1A-FR::scFv-1

Día de recogida	SLT-1A-combinación 1::scFV-1		SLT-1A-combinación 10::scFV-1		SLT-1A-combinación 12::scFV-1		SLT-1A-combinación 15::scFV-1		SLT-1A-FR::scFv-1 de referencia 1
	señal prom.	porc. de ref. 1	señal prom.	porc. de ref. 1	señal prom.	porc. de ref. 1	señal prom.	porc. de ref. 1	señal prom.
1	0	N/A	0	N/A	0	N/A	0	N/A	0
15	0,136	41,14	0,004	1,17	0,020	6,09	0,009	2,88	0,329
22	0,442	61,54	0,023	3,24	0,063	8,71	0,053	7,43	0,719
29	0,937	47,81	0,065	3,33	0,547	27,89	0,215	10,98	1,959
36	1,949	94,08	0,551	26,60	1,117	53,90	0,551	26,59	2,072
40	2,247	99,19	0,873	38,55	1,576	69,57	0,832	36,75	2,65

Día de recogida	SLT-1A-combinación 10::scFV-1		SLT-1A-combinación 1::scFv-1 de referencia 2
	señal ELISA prom.	porc. de ref. 2 SLT-1A-combinación 1::scFV-1	señal ELISA prom.
1	0	N/A	0
15	0,004	2,85%	0,136
22	0,023	5,27%	0,442
29	0,065	6,97%	0,937
36	0,551	28,27%	1,949
40	0,873	38,87%	2,247

[0819] Los resultados del cuarto estudio de inmunogenicidad fueron que las moléculas de ejemplo dirigidas a células

5 probadas exhibieron inmunogenicidades reducidas en comparación con la molécula de referencia celular SLT-1A-FR::scFv-1, al menos en puntos temporales anteriores (Figura 14-panel A; Tabla 16). Se recogieron los sueros antes del tratamiento en el día 1. Para las moléculas de reconocimiento celular analizadas, las respuestas de IgG anti "molécula de reconocimiento celular" se observaron por primera vez el día 15 (3 días después de la administración de la sexta dosis) y, a continuación, se observaron respuestas murino IgG en todos los puntos de tiempo
 10 posteriores: Día 22 (10 días después de la administración de la sexta dosis, antes de la administración de la 7<sup>a</sup> dosis), Día 29 (3 días después de la administración de la novena dosis antes de la administración de la 10<sup>a</sup> dosis), Día 36 (3 días después de la administración de la última dosis) y Día 40 (7 días después de la administración de la última dosis) (Figura 14; Tabla 16). Tanto en el día 15 como en el día 22 y el día 29, los ratones en el grupo
 15 administraron la molécula de referencia celular dirigida SLT-1A-FR::scFv-1 exhibieron mayores magnitudes de respuestas de anticuerpos IgG totales como se muestra por la señal de ELISA que los ratones en los grupos administrados a modo de ejemplo de moléculas de reconocimiento celular que comprenden los andamios efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión de proteasa desinmunizados (SLT-1A-combinación1, SLT-1A-combinación10, SLT-1A-combinación12 y SLT-1A-combinación15) (Figura 16; Tabla 16). En todos los puntos de tiempo, el porcentaje de la señal ELISA de referencia promedio de los valores promedio de la señal ELISA para el grupo de tratamiento SLT-1A-combinación1::scFv-1 fue mayor que el porcentaje de los valores promedio de la señal ELISA para los grupos de tratamiento administrados SLT-1A-combinación10::scFv-1, SLT-1A-combinación12::scFv-1 y SLT-1A-combinación15::scFv-1. En los días 36 y 40, los porcentajes de la señal ELISA de referencia promedio de los valores de la señal ELISA promedio para el grupo de tratamiento administrado SLT-1A-combinación12::scFv-1 fueron mayores que para el grupo de tratamiento administrado SLT-1A-combinación10::scFv-1 y SLT-1A-combinación15::scFv-1. Estos resultados sugieren que las moléculas de reconocimiento celular cuya región del polipéptido efector de la toxina Shiga consiste en la combinación, andamio de polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión de la combinación, inmunizada, SLT-1A-combinación1, SLT-1A-combinación10, SLT-1A-combinación12, y SLT-1A-combinación15 muestran una inmunogenicidad reducida en comparación con las
 20 moléculas de reconocimiento celular cuya región del polipéptido efector de la toxina Shiga consiste en (1) un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje o (2) el polipéptido efector de la toxina Shiga resistente a la escisión por furina SLT-1A-FR.

30 [0820] De las moléculas de reconocimiento celular probadas en el segundo, tercer y cuarto estudios en ratones, la combinación, inmunizada, resistente a la escisión de la proteasa, andamio efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación10 parecía ser la más desinmunizada mediante este ensayo de inmunogenicidad relativa en las condiciones probadas (ver Figuras 15-16; Tablas 14-16). Este andamio efector de toxina Shiga comprendía (1) cinco regiones de epitopo alteradas, dos de las cuales involucraban múltiples sustituciones de residuos de aminoácidos y (2) una región de epitopo endógeno alterada por un epitopo de células T heterólogo integrado. En el segundo estudio, la combinación, inmunizada, resistente a la escisión de proteasa, andamio efector de toxina Shiga SLT-1A-combinación16 parecía estar más inmunizada que la combinación, desinmunizada, resistente a la escisión de proteasa, andamio efector de toxina Shiga SLT-1A-combinación19, especialmente en puntos temporales anteriores (ver Figura 15-panel B; Tabla 14). En el cuarto estudio, la combinación, inmunizada, resistente a la escisión de la proteasa, andamio efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación1 parecía ser la menos desinmunizada de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga probados SLT-1A-combinacións (1, 10, 12 y 15) (ver Figura 16-panel A; Tabla 16). En el cuarto estudio, la combinación, inmunizada, resistente a la escisión de proteasas, el andamio efector de toxina Shiga SLT-1A-combinación15 parecía estar más inmunizada que SLT-1A-combinación12, especialmente en puntos de tiempo posteriores (ver Figura 16 -Panel A; Tabla 16).

45 [0821] Los resultados de estos estudios de inmunogenicidad indican que dos tipos de alteraciones en la región del epitopo, sustituciones de residuos de aminoácidos y epitopos de células T CD8 + integrados, heterólogos, pueden contribuir a la desinmunización de un polipéptido efector de toxina Shiga. Además, la combinación de ambos tipos de alteraciones en el mismo polipéptido efector de toxina Shiga puede dar como resultado un polipéptido efector de toxina Shiga más inmunizado. La magnitud general de la inducción de anticuerpos en los ratones en los grupos
 50 administrados a modo de ejemplo de moléculas citotóxicas de reconocimiento celular que comprenden estas combinaciones de polipéptidos efectores de la toxina Shiga hiperinmunizados, resistentes a la escisión de la proteína y células inmunitarias de células T CD8 +. a la magnitud de la inducción de anticuerpos en los ratones en el grupo al que se administró la molécula de reconocimiento celular que comprende la región del polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje resistente a la escisión de la proteasa pero que de otro modo es de tipo salvaje. Las disminuciones en los valores de la señal de ELISA de las moléculas que se dirigen a las células que comprenden ciertos andamios efectores de toxina Shiga, desinmunizados, resistentes a la escisión de la proteasa, combinados demuestran que estos andamios particulares se desinmunizaron con éxito (es decir, habían reducido el potencial inmunogénico en mamíferos). Así, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga SLT-1A-combinación1, SLT-1A-combinación7, SLT-1A-combinación10, SLT-1A-combinación12, SLT-1A-combinación15, SLT-1A-combinación16 y
 60 SLT-1A-combinación19 exhibidos potencial inmunogénico reducido en mamíferos, y cualquier molécula de ejemplo de reconocimiento celular que comprenda estos polipéptidos se debe inmunizar en comparación con una molécula análoga que comprende solo polipéptidos efectores de la toxina Shiga de tipo salvaje o meramente resistentes a la escisión de proteasa debido a la escisión por furina mutaciones de motivos en la región situada de forma nativa a partir de los residuos de aminoácidos 238 a 257 en StxA y SLT-1A.

[0822] Las diferencias observadas en los potenciales inmunogénicos de los diferentes polipéptidos efectores de toxina Shiga, inmunizados, resistentes a la escisión de la proteasa, inmunizados y probados muestran que ciertas combinaciones de subregiones desinmunizadas y/o subregiones de epítomos de células T incrustadas Reduce la inmunogenicidad en diferentes magnitudes. Por ejemplo, en el estudio 2, SLT-1A-combinación10 se desinmunizó más que SLT-1A-combinación16 y SLT-1A-combinación 19, especialmente en puntos de tiempo posteriores (Tabla 14; Figura 15-panel B), a pesar de combinación16 y combinación19 que comprende regiones de epítomo más alteradas y sustituciones de residuos de aminoácidos totales en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje que comprende SLT-1A-combinación10 (Tabla 8). En el estudio 4, SLT-1A-combinación10 se desinmunizó más que SLT-1A-combinación12, especialmente en puntos de tiempo posteriores (Tabla 16; Figura 16-panel A) a pesar de que tanto SLT-1A-combinación12 como SLT-1A-combinación15 comprende más regiones de epítomos alterados y sustituciones de residuos de aminoácidos totales en comparación con una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje que SLT-1A-combinación10 comprende (Tabla 8). Por lo tanto, la combinación acumulativa de alteraciones adicionales de la región del epítomo de células B no necesariamente dio como resultado disminuciones adicionales en la inmunogenicidad, sino que puede aumentar la inmunogenicidad no deseada, como, por ejemplo, en puntos temporales posteriores (ver Figura 15, panel B y compare los resultados para SLT-1A-combinación10 con los resultados para SLT-1A-combinación16 y SLT-1A-combinación19).

#### I. Ensayo de la capacidad de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo para administrar un péptido-epítomo de células T a la ruta de MHC clase I de una célula para su presentación

[0823] La presentación de un epítomo de células T por el sistema MHC de clase I se dirige a la célula presentadora para matar por lisis mediada por CTL y también desencadena la estimulación inmune en el área local. Mediante la ingeniería de moléculas de reconocimiento celular que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga que comprenden epítomos inmunogénicos heterólogos, se puede lograr el suministro dirigido y la presentación de antígenos inmunoestimuladores. La presentación de antígenos inmunoestimulantes no propios, tales como, por ejemplo, antígenos virales conocidos con alta inmunogenicidad, mediante señales de células diana a otras células inmunes para destruir las células diana, así como para reclutar más células inmunes a esa área dentro de un organismo.

[0824] Para desinmunizar y proporcionar simultáneamente la presentación del epítomo de células T en la superficie de la célula diana dentro de la misma región del polipéptido efector de la toxina Shiga, una región del epítomo de células B predicha se interrumpió reemplazando los residuos de aminoácidos dentro de ella con un La región del epítomo de células T inmunogénicas predice que se unirá a las moléculas de MHC de clase I humanas.

[0825] En este ejemplo, se investigan las capacidades de las moléculas de direccionamiento de células de ejemplo de la presente invención para suministrar epítomos de células T a la ruta MHC de clase I de las células diana para su presentación en la superficie celular objetivo. Además, las consecuencias funcionales de la presentación de MHC de clase I de las células diana de los epítomos de células T administradas por moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención se investigan observando diversas respuestas inmunes inducidas por la presentación del péptido del epítomo administrado por un MHC Yo molécula

1. Ensayo de la capacidad de una molécula para administrar un péptido-epítomo de células T a la ruta de MHC de clase I para su presentación en la superficie celular

[0826] Los ensayos de rutina conocidos en la técnica se usan para investigar la capacidad de las moléculas de ejemplo de la presente invención para administrar un epítomo de células T a una molécula de MHC de clase I (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/113007). En particular, se usa un procedimiento de citometría de flujo para demostrar la administración y la presentación extracelular de un péptido-epítomo de células T (insertado o integrado en un polipéptido efector de toxina Shiga) en complejo con moléculas de MHC de clase I en las superficies de las células diana. Este procedimiento de citometría de flujo utiliza reactivos multímeros solubles del receptor de células T humanas (TCR) (receptor de antígeno de células T solubles STAR™ Multimer, Altor Bioscience Corp., Miramar, FL, EE. UU.), Cada uno con alta afinidad de unión a un epítomo diferente-complejo HLA humano.

[0827] Cada reactivo multímero STAR™ TCR se deriva de un receptor de células T específico y permite la detección de un complejo péptido-MHC específico basado en la capacidad del TCR elegido para reconocer un péptido específico presentado en el contexto de una clase de MHC particular Yo molécula Estos multímeros de TCR están compuestos de TCR humanos recombinantes que han sido biotinilados y multimerizados con estreptavidina. Los multímeros de TCR están etiquetados con ficoeritrina (PE). Estos reactivos multiméricos de TCR permiten la detección de complejos específicos de péptido-MHC de clase I presentados en las superficies de las células humanas porque cada tipo de multímero TCR soluble reconoce y se une de manera estable a un complejo péptido-MHC específico en condiciones variadas (Zhu X et al., J Immunol 176: 3223-32 (2006)). Estos reactivos multiméricos de TCR permiten la identificación y cuantificación por citometría de flujo de complejos péptido-MHC de clase I presentes en las superficies de las células.

[0828] Las células diana utilizadas en este ejemplo están disponibles en el ATCC (Manassas VA, EE. UU.), El

Instituto Nacional del Cáncer de EE. UU. (Frederick, MD, EE. UU.) Y/o DSZM (Braunschweig, DE). Usando procedimientos de citometría de flujo estándar conocidos en la técnica, se confirma que las células diana expresan en sus superficies celulares tanto la molécula MHC-clase I apropiada como la biomolécula objetivo extracelular de la fracción de reconocimiento celular de las moléculas de reconocimiento celular utilizadas en este Ejemplo. .

5 [0829] Las células diana se tratan con moléculas de ejemplo de dirección celular de la presente invención que comprenden cada una un polipéptido efector de toxina Shiga que comprende un epítipo de células T integrado o insertado. Ciertas moléculas de ejemplo de la presente invención probadas en este Ejemplo se deterioran catalíticamente o se inactivan mediante la adición de una o ambas de las siguientes mutaciones: Y77S y E167D. Los  
10 conjuntos de células diana se tratan mediante la administración exógena de las diferentes moléculas de ejemplo de células diana de la invención a concentraciones similares a las utilizadas por otros, teniendo en cuenta las sensibilidades específicas del tipo de célula a las toxinas Shiga (véase, por ejemplo, Noakes K et al., FEBS Lett 453: 95-9 (1999)). Las células tratadas se incuban a continuación durante seis horas en condiciones estándar, incluyendo a 37 ° C y una atmósfera con 5% de dióxido de carbono, para permitir la intoxicación mediada por una región  
15 polipeptídica efectora de la toxina Shiga. A continuación, las células se lavan con medio de cultivo celular, se resuspenden en medio de cultivo celular nuevo y se incuban durante 20 horas antes de tñirlas con el reactivo multímero STAR <sup>TM</sup> apropiado. También se prueban puntos de tiempo adicionales y condiciones de configuración.

[0830] Como controles, se tratan conjuntos de células diana en tres condiciones: 1) sin ningún tratamiento ("no  
20 tratado"), lo que significa que no se añaden moléculas exógenas, 2) con péptido antígeno-control de control administrado de manera exógena, y 3) con administración exógena de péptido control antígeno-péptido combinado con un potenciador de carga de péptidos ("PLE", Altor Bioscience Corp., Miramar, FL, EE. UU.). El péptido control antígeno-péptido combinado con el tratamiento PLE permitió la carga de péptidos exógenos y sirvió como control  
25 positivo. Las células que muestran el haplotipo MHC de clase I apropiado pueden verse obligadas a cargar el péptido apropiado aplicado exógenamente desde un espacio extracelular (es decir, en ausencia de internalización celular del péptido aplicado) o en presencia de PLE, que es una mezcla de B2-microglobulina y otros componentes.

[0831] Después de los tratamientos, todos los conjuntos de células se lavan y se incuban con el reactivo multímero STAR apropiado durante una hora en hielo. Las células se lavan y la fluorescencia de las muestras se mide por  
30 citometría de flujo usando un citómetro de flujo Accuri <sup>TM</sup> C6 (BD Biosciences, San José, CA, EE. UU.) Para detectar la presencia y cuantificar cualquier multímero STAR <sup>TM</sup> unido a las células de la población (a veces denominado en el presente documento "tinción").

[0832] El control no tratado se usa para identificar las poblaciones de células positivas y negativas empleando una  
35 puerta que da como resultado menos del 1% de las células del control no tratado en la puerta "positiva" (que representa la señal de fondo). A continuación se aplica la misma puerta a las otras muestras para caracterizar la población positiva para cada muestra.

[0833] La detección del epítipo de células T integrado o insertado administrado de manera exógena complejo con  
40 moléculas de MHC de clase I humana en la superficie celular de las células diana intoxicadas demuestra que las moléculas de reconocimiento celular que comprenden el péptido-epítipo de células T embebidas o insertadas son capaz de ingresar a las células diana, realizar un enrutamiento subcelular suficiente y administrar suficiente epítipo de células T a la ruta MHC clase I para la presentación de la superficie en la superficie de la célula diana.

45 2. Ensayo de la capacidad de una molécula para inducir la citólisis mediada por células T citotóxicas de células diana y otras respuestas inmunes

[0834] Los ensayos de rutina conocidos en la técnica se usan para investigar las consecuencias funcionales de la  
50 presentación de MHC de clase I de las células diana de epítopos de células T administrados por moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención (véase, por ejemplo, WO 2015/113007). Las consecuencias funcionales para investigar incluyen la activación de CTL, la muerte de células diana mediada por CTL y la liberación de citocinas por CTL.

[0835] Se usa un ensayo de citotoxicidad basado en CTL para evaluar las consecuencias de la presentación del  
55 epítipo. El ensayo involucra células diana y células T cultivadas en tejido. Las células diana están intoxicadas como se describe en el documento WO 2015/113007. Brevemente, las células diana se incuban durante seis horas en condiciones estándar con diferentes moléculas de reconocimiento celular dirigidas exógenamente, donde ciertas moléculas de reconocimiento celular comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga de la invención. A continuación, se agregan CTL a las células diana intoxicadas y se incuban para permitir que las células T  
60 reconozcan y se unan a cualquier célula diana que muestre complejos de epítipo-péptido/MHC de clase I. A continuación, se investigan ciertas consecuencias funcionales utilizando procedimientos estándar conocidos por el experto, que incluyen la unión de CTL a las células diana, la destrucción de células diana por citólisis mediada por CTL y la liberación de citocinas, como interferón gamma o interleucinas por ELISA o ELISpot.

65 [0836] La activación de CTL por células diana que muestran complejos de epítipo-péptido/MHC de clase I se

cuantifica usando ensayos de respuesta CTL disponibles comercialmente, por ejemplo, ensayos no radiactivos CytoTox96® (Promega Corp., Madison, WI, EE. UU.), Granzyme B ELISpot ensayos (Mabtech, Inc., Cincinnati, OH, EE. UU.), ensayos de actividad de caspasa y ensayos de citometría de flujo de translocación LAMP-1. Para controlar específicamente la destrucción de células diana mediada por CTL, se usa el éster succinimidílico de carboxifluoresceína (CFSE) para dirigir las células para la investigación in vitro e in vivo como se describe en la técnica (ver, por ejemplo, Durward M et al., J Vis Exp 45 pii 2250 (2010)).

Resumen del ejemplo 2

[0837] Ejemplos de moléculas de reconocimiento celular que comprenden combinación, polipéptido efector de toxina Shiga con múltiples alteraciones en la región del epítipo de células B se desinmunizaron como se muestra mediante reducciones tanto en la antigenicidad como en la inmunogenicidad en comparación con las moléculas de referencia. Además, este ejemplo muestra que ciertas moléculas de reconocimiento celular desinmunizadas que comprenden combinación, polipéptidos efectores de toxina Shiga que comprenden múltiples alteraciones en la región del epítipo de células B, alteraciones en el motivo de escisión por furina y/o epítipos de células T integrados se mantienen a un nivel significativo de una o más funciones efectoras de la toxina Shiga, tales como, por ejemplo, inhibición catalítica del ribosoma, enrutamiento intracelular y citotoxicidad.

[0838] La Tabla 17 resume los resultados del Ejemplo 2 para las moléculas de ejemplo, de reconocimiento celular, inmunizadas y resistentes a la escisión de proteasa de la presente invención que comprenden el polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación1, SLT-1A-combinación7, SLT-1A-combinación10, SLT-1A-combinación12, SLT-1A-combinación15, SLT-1A-combinación16 o SLT-1A-combinación 19.

**Tabla 17.** Resumen de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo ensayadas empíricamente para determinar la citotoxicidad y el potencial inmunogénico reducido en mamíferos

<b>estructuras de moléculas de reconocimiento celular</b>	<b>Citotoxicidad (CD<sub>50</sub> en mM) varía con la línea celular</b>	<b>Inmunogenicidad en comparación con SLT-1A-FR:scFv-1</b>
SLT-1A-combinación 1::scFV-1	0,02	41-99 %
SLT-1A-combinación 7::scFV-1	0,01, 0,02, 0,03, 0,12, 0,13, 0,39	4-26 %
SLT-1A-combinación 10::scFV-1	0,03, 0,07, 0,08, 0,25, 0,84	1-43%
SLT-1A-combinación 12::scFV-1	0,07, 0,18	6-70%
SLT-1A-combinación 15::scFV-1	0,05, 0,09	3-37%
SLT-1A-combinación 16::scFV-1	0,03, 0,12	14-72%
SLT-1A-combinación 19::scFV-1	0,03, 0,16	64-107%
SLT-1A-FR::scFV-1	0,01, 0,02, 0,05, 0,10, 0,28	100%

[0839] Las moléculas de ejemplo, dirigidas a células, inmunizadas, resistentes a la escisión de proteasa de la invención mostradas en la Tabla 17, exhibieron niveles significativos de citotoxicidad que eran comparables a las moléculas de reconocimiento celular que comprenden fragmentos de toxina Shiga A1 de tipo salvaje. Estas moléculas de ejemplo, segmentadas por proteasas, inmunizadas y dirigidas a células de la invención exhiben una inhibición catalítica de la traducción por ribosomas, enrutamiento intracelular comparable a la subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje y/o al fragmento A1, y citotoxicidad comparable a una moléculas de reconocimiento celular que comprenden un fragmento de toxina Shiga A1 de tipo salvaje y/o una subunidad A. Estas moléculas de ejemplo de inmunización de reconocimiento celular resistentes a la escisión de proteasa de la invención exhiben niveles de actividad catalítica comparables a una subunidad de la toxina Shiga de tipo salvaje y/o un fragmento A1. Estas moléculas de ejemplo, segmentadas por proteasas, inmunizadas y dirigidas a células de la invención exhiben niveles de citotoxicidad comparables a una subunidad de toxina Shiga de tipo salvaje y/o un fragmento A1. Todas estas moléculas de reconocimiento celular de la invención exhibieron una inmunogenicidad reducida en mamíferos en comparación con las moléculas de reconocimiento celular que comprenden una región de polipéptido efector de toxina Shiga que consiste en (1) un fragmento A1 de toxina Shiga de tipo salvaje y/o (2) la furina resistente a la ruptura, polipéptido efector de toxina Shiga SLT-1A-FR. Además, ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención exhiben una mayor estabilidad, una tolerabilidad mejorada in vivo y/o la capacidad de administrar epítipos de células T heterólogas para la presentación de MHC de clase I por las células diana.

[0840] Los resultados mostrados en el Ejemplo 2 refuerzan la idea de que varias alteraciones de ejemplo de la región del epítipo se pueden combinar en una sola molécula para crear mayores reducciones en la antigenicidad y/o inmunogenicidad mientras se conservan niveles significativos de una o más funciones efectoras de toxina Shiga (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/113005) y, a veces, proporcionan otras características funcionales que no están presentes en las subunidades A de la toxina Shiga de tipo salvaje, como, por ejemplo, la resistencia a la escisión por furina y/o la capacidad de administrar un epítipo de células T heterólogas a una célula diana. Ciertos polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga desinmunizados combinados de la presente invención exhiben reducciones sinérgicas en la inmunogenicidad en comparación con la suma de sus subregiones parcialmente desinmunizadas, tales como, por ejemplo, SLT-1A-combinación7 SLT- 1A-combinación10 y SLT-1A-

combinación15.

[0841] Las siguientes sustituciones se han realizado y probado en al menos un polipéptido efector de toxina Shiga que retuvo un nivel significativo de inhibición de ribosoma y/o citotoxicidad in vitro K1A, K1M, T4I, S8I, T9I, K11A, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, T45V, S45I, T45I, G46P, D47M, N48V, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, G110A, D111T, D141A, V154A, G147A, T18, D18, T18, T18, 18, 18, 18, 18, 18, 18, 18, D184A, D184F, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, S189A, D198A, R205A, C242S, R248A y R251A.

[0842] A pesar de los desafíos que predicen las sustituciones exitosas a priori, los datos proporcionados en los Ejemplos en el presente documento dan razones para creer que ciertas sustituciones de aminoácidos pueden reducir con éxito la antigenicidad y/o inmunogenicidad mientras se mantienen funciones efectoras de toxina Shiga significativas. El término "exitoso" se usa aquí para significar una o más sustituciones de residuos de aminoácidos en una región del epítipo predicha que dio como resultado un polipéptido efector de toxina Shiga que retuvo una o más funciones efectoras de toxina Shiga. Por ejemplo, las sustituciones en las posiciones de aminoácidos específicas que se muestran en el presente documento como tolerancias de sustituciones exitosas pueden ser exitosas para retener al menos una función efectora de la toxina Shiga cuando se sustituyen con ciertos otros aminoácidos. La sustitución exitosa de un solo aminoácido generalmente se puede combinar con otras sustituciones exitosas de aminoácidos en una región del epítipo diferente para generar polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados que retienen funciones significativas del efector de la toxina Shiga. De manera similar, la demostración de que las moléculas que se dirigen a las células que comprenden regiones de polipéptidos efectores de toxina Shiga con múltiples sustituciones de aminoácidos individuales dentro de la misma región del epítipo retienen actividad enzimática sugiere que la sustitución exitosa de un solo aminoácido en la misma región del epítipo generalmente se puede combinar con otro aminoácido único sustituciones en la misma región del epítipo para generar polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados que retienen la función o funciones efectoras de la toxina Shiga significativas.

[0843] Se ha demostrado empíricamente que ciertas sustituciones (K1A, K1M, T4I, S8I, T9I, K11A, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, T45V, S45I, T45I, G46P, D47M, N48V, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G62A, D96A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, G110A, D111T, D141A, G147A, V154A, G147A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, S189A, D198A, R205A, C242S, R248A, R251A y/o sus combinaciones) y ciertas posiciones toleraron sustituciones (1, 4, 8, 9, 11, 33, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 94, 96, 104, 105, 107, 108, 109, 110, 111, 141, 147, 154, 180, 181, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 198, 205, 242, 248 y 251) mientras se mantiene un nivel significativo de actividad para al menos una función efectora de la toxina Shiga. Estos datos empíricos sugieren ciertas otras sustituciones disruptivas del epítipo y combinaciones de sustituciones disruptivas del epítipo que pueden usarse para generar polipéptidos efectores de la toxina Shiga desinmunizados que retienen funciones significativas del efector de la toxina Shiga. Es predecible que otras sustituciones de aminoácidos a residuos de aminoácidos de un grupo funcional conservador también serán toleradas. Por ejemplo, otras sustituciones conocidas por el trabajador calificado son similares a cualquiera de K1A, K1M, T4I, S8I, T9I, K11A, S33I, S33C, S43N, G44L, S45V, T45V, S45I, T45I, G46P, D47M, N48V, L49A, F50T, A51V, D53A, D53N, V54L, V54I, R55A, R55V, R55L, G56P, I57F, I57M, D58A, D58V, D58F, P59A, P59F, E60I, E60T, E60R, E61A, E61V, E61L, G60, D94A, S96I, T104N, A105L, T107P, L108M, S109V, G110A, D111T, D141A, G147A, V154A, G147A, T180G, T181I, D183A, D183G, D184A, D184F, L185D, S186A, S186F, G187A, G187T, R188A, S189A, D198A, R205A, C242S, R248A o R251A también podrán interrumpir un epítipo mientras mantienen al menos una función efectora de la toxina Shiga.

### **Ejemplo 3. Polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga resistentes a la escisión por furina y moléculas de reconocimiento celular que comprenden los mismos**

[0844] Los polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga de la escisión por furina se crearon y probaron como componentes de moléculas de reconocimiento celular en las que cada molécula de reconocimiento celular comprendía una región de unión de reconocimiento celular, de tipo inmunoglobulina. Para diseñar la resistencia a la proteasa en un polipéptido efector de la toxina Shiga, se introdujeron dos sustituciones de residuos de aminoácidos, R248A y R251A, en los polipéptidos efectores de la toxina Shiga como se describe en el Ejemplo 2. El polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-FR (SEQ ID NO: 5) se utilizó para crear la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-FR::scFv-9 (SEQ ID NO: 41).

#### A. Cuantificación de la escisión por furina de una molécula de la presente invención en relación con una molécula de referencia

[0845] La molécula de reconocimiento celular SLT-1A-FR::scFv-9 (SEQ ID NO: 41) se probó usando un ensayo in vitro de escisión por furina para cuantificar la escisión por furina en comparación con un control de tipo salvaje usando procedimientos conocido por el trabajador calificado (véase, por ejemplo, WO 2015/191764). Para evaluar la

capacidad de la furina para escindir SLT-1A-FR::scFv-9, se incubaron muestras de proteínas purificadas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con furina (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.) A 0,5 unidades de actividad de furina (U) por microgramo (g) de proteína de la muestra en tampón de escisión por furina (100 milimolar (mM) HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetasulfónico ácido), pH 7, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) durante 30 horas a 30 ° C. Las muestras de control se incubaron sin furina a 4 ° C o 30 ° C en el mismo tampón. Las diversas muestras de moléculas de reconocimiento celular se sometieron a electroforesis en SDS, geles de poli(acrilamida) en condiciones desnaturizantes y se tiñeron con Coomassie (Figura 17).

[0846] La Figura 17 muestra una imagen de un gel con los carriles numerados y una leyenda de la figura que indica qué carril se cargó con qué muestra: una molécula de reconocimiento celular que comprende una región de polipéptido efector de toxina Shiga de tipo salvaje (SLT-1A-WT) o un sitio de escisión por furina alterado, polipéptido efector de toxina Shiga (SLT-1A-FR). Los carriles marcados como "Marcador MW" muestran el patrón de migración de una escalera de peso molecular de proteínas junto con el tamaño aproximado de las bandas de proteínas de escalera individuales en kiloDaltons (kDa) para usar como una referencia interna de peso molecular que permite la estimación de los tamaños de las proteínas. en los carriles numerados La leyenda de la figura indica las condiciones de pretratamiento de las muestras de moléculas de reconocimiento celular con la temperatura en grados Celsius (° C), la duración y si se agregó algo de furina al denotar la cantidad de unidades de actividad de furina por microgramo (etiquetada "U/μg furin ") o "no furin "para cero unidades.

[0847] La Figura 17 muestra que SLT-1A-FR::scFv-9 (SEQ ID NO: 41) era resistente a la escisión proteolítica por la furina humana. Las moléculas de reconocimiento celular probadas en este ensayo tenían un tamaño de aproximadamente 56 kDa y comprendían un polipéptido efector de toxina Shiga de aproximadamente 28 kDa (tamaño idéntico para SLT-1A-WT o SLT-1A-FR) unido a un carboxi. enlazador terminal y región de unión que juntas tenían un tamaño de aproximadamente 28 kDa. Si la escisión con furina hubiera ocurrido en la superficie expuesta, el bucle extendido 242-251 de SLT-1A, el resultado esperado sería dos bandas de proteínas con pesos moleculares casi iguales de alrededor de 28 kDa cada una. Si la escisión por furina ocurre precisamente en el enlace del péptido carboxi de la arginina en la posición 251 del andamio WT en SLT-1A-WT::scFv-9, entonces las dos bandas de proteínas resultantes deberían tener los pesos moleculares de 27.5 kDa para SLT-1A (WT o FR) y de 28,3 kDa para scFv-9.

[0848] El gel se analizó usando el software GelAnalyzer 2010. Este software detectó los carriles del gel representados en la Figura 17 y las bandas dentro de cada carril. Usando el modo de sustracción de fondo, el fondo se definió y se resta automáticamente de los volúmenes de todas las bandas analizadas usando una sustracción de fondo de bola rodante con el radio de bola establecido en 25. Los resultados de este análisis cuantitativo de banda del gel representado en la Figura 17 se resumen en Tabla 18. La Tabla 18 muestra la movilidad relativa y los valores de volumen bruto para ciertas bandas que migran alrededor de 56 kDa en los carriles 1-6 en el gel representado en la Figura 17. El tratamiento "sin furina" a 4 ° C de la molécula de reconocimiento celular (SLT) -1A-WT::scFv-9 (SEQ ID NO: 42), que comprende un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje, los resultados en el carril # 2 se utilizaron como control para determinar el porcentaje de material sin escindir a 30 ° C en ausencia o presencia de furin (carriles # 2 y # 3, respectivamente). Para las muestras SLT-1A-FR::scFv-9, se usó el carril "sin furin" a 4 ° C (carril # 4) para determinar el porcentaje de material no cortado a 30 ° C en ausencia o presencia de furin (carriles # 5 y # 6, respectivamente). Para cada molécula, el "porcentaje sin escindir" de la banda de ~56 kDa para cada muestra tratada con furina se calculó mediante la siguiente fórmula: (Volumen bruto de la banda de muestra de ~56 kDa)/(Volumen bruto de la banda de ~56 kDa de "no furin" a 4 ° C tratamiento) x 100 (ver Tabla 18).

**Tabla 18.** Cuantificación de la escisión por furina en relación con una molécula de referencia

Tratamiento	Carril #	Movilidad relativa (R <sub>f</sub> ) de banda de ~ 56 kDa	Volumen en bruto	Porcentaje no escindido
<b>SLT-1A-WT::scFv-9</b>				
sin furina, 4° C	1	0,39	753	100,0 %
sin furina, 30° C	2	0,36	766	101,7 %
0,5 U/μg/furina, 30 °C	3	0,34	246	32,7 %
<b>SLT-1A-FR::scFv-9</b>				
sin furina, 4° C	4	0,37	995	100,0 %
sin furina, 30° C	5	0,39	985	99,0 %
0,5 U/μg/furina, 30 °C	6	0,37	1000	100,5 %

[0849] Para las muestras de sitio de furina de tipo salvaje, la cantidad de proteína en la banda de ~ 56 kDa para la muestra incubada con furina se redujo en comparación con la cantidad de proteína en la banda de ~ 56 kDa para muestras "sin furina" (Tabla 18; Figura 17, carril # 3 en comparación con los carriles # 1 y # 2). El tratamiento con furina de SLT-1A-WT::scFv-9 resultó en la producción de dos nuevas bandas de aproximadamente 28 kDa (Figura 17, carril # 3), que coinciden con los tamaños esperados de los productos de escisión por furina resultantes de la



escisión en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento de toxina Shia A1 de SLT-1A-WT::scFv-9. Para las muestras SLT-1A-FR::scFv-9, la cantidad de proteína en la banda de ~ 55 kDa en la muestra incubada con el carril de furina no cambió con respecto a la cantidad de proteína en la banda de ~ 55 kDa para las muestras "sin furina" (Tabla 18; Figura 17, carril # 6 en comparación con los carriles # 4 y # 5).

5 [0850] Este análisis cuantitativo mostró que una molécula de reconocimiento celular diseñada con el polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje SLT-1A-WT y una región de unión carboxi-terminal exhibía aproximadamente un 67,3% de escisión con aproximadamente un 32,7% de SLT-1A-WT::scFv-9 restante sin cortar. El porcentaje de escisión por furina en comparación con una molécula de referencia se puede expresar como una relación de [(material disponible - sin cortar)/material disponible] de la molécula de interés a [(material disponible - sin cortar)/material disponible] de la referencia molécula. En este ensayo, SLT-1A-FR::scFv-9 exhibió [(985-1000)/1000]/[(766-246)/766] = -1.5% de escisión de la referencia o aproximadamente cero escisión.

10 [0851] Este ensayo mostró que una molécula de reconocimiento celular diseñada con el polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-FR exhibía un 0% de escisión y el 100% de la molécula de reconocimiento celular permanecía sin escindir. Por lo tanto, el armazón SLT-1A-FR parece ser resistente a la escisión por furina en este ensayo en las condiciones probadas.

#### 20 B. Ensayo de la tolerabilidad in vivo de las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención utilizando animales de laboratorio

[0852] La tolerabilidad in vivo de moléculas de ejemplo dirigidas a células de la presente invención se prueba usando ratones para determinar el grado en que se detectaron efectos adversos evidentes a diversas dosis de muestras de moléculas de reconocimiento celular. Los estudios de tolerabilidad se realizan utilizando procedimientos conocidos por el experto y/o descritos en este documento (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/191764). Por ejemplo, a los ratones se les inyectan muestras de moléculas de reconocimiento celular o controles de vehiculos a dosis que varían de 0.25 a 5.00 miligramos por kilogramo de peso corporal por inyección (mg/kg/inj) durante tres veces por semana durante varias semanas. Con el fin de evaluar la tolerabilidad in vivo, los ratones inyectados son monitoreados para detectar cambios en la salud y signos clínicos, tales como, por ejemplo, aspectos de morbilidad, morbilidad, peso corporal, apariencia física, signos clínicos medibles, comportamiento no provocado y respuestas a estímulos externos., tales como (véase, por ejemplo, Morton D, Griffiths P, Vet Rec 116: 431-43 (1985); Montgomery C, Cancer Bull 42: 230-7 (1990); Ullman-Culleré M, Foltz C, Lab Anim Sc 49 : 319-23 (1999); Clingerman K, Summers L, J Am Assoc Lab Anim Sci 51: 31-6 (2012)). La eutanasia puede usarse en respuesta a signos de morbilidad y/o morbilidad y, por lo tanto, crear un punto temporal de mortalidad. Por ejemplo, una disminución en el peso corporal del 15-20% en 2-3 días puede usarse como un signo de morbilidad en los roedores y como justificación para la eutanasia (ver, por ejemplo, la Guía del Instituto de Investigación Animal de Laboratorio 2011. para el cuidado y uso de animales de laboratorio, 8ª ed., Washington, DC, EE. UU. : National Academies Press).

40 [0853] Las moléculas de reconocimiento celular de la presente invención que comprenden polipéptidos efectores de toxina Shiga resistentes a la escisión por furina exhiben una tolerabilidad mejorada (por ejemplo, perfiles de toxicidad inespecífica mejorados) en comparación con moléculas de referencia relacionadas que comprenden fragmentos de toxina Shiga A1 de tipo salvaje (véase, por ejemplo, el documento WO 2015/191764). Dicha tolerabilidad in vivo mejorada puede deberse a la mayor estabilidad de un enlace entre un polipéptido efector de toxina Shiga y una región de unión y/o componente tóxico de la molécula de reconocimiento celular.

#### 45 C. Ensayo de la citotoxicidad dirigida y la eficacia de las moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención in vivo usando modelos animales

50 [0854] Los modelos animales se usan para determinar los efectos in vivo de combinación (n) de polipéptidos efectores de toxina Shiga de ejemplo y moléculas de reconocimiento celular que comprenden las células neoplásicas positivas a las mencionadas anteriormente. Se usan varias cepas de ratones para probar los efectos de las moléculas de reconocimiento celular en tumores de xenoinjerto en ratones después de la administración intravenosa de cada molécula a esos ratones. En ciertos experimentos, se usa un modelo de xenoinjerto diseminado para tumores humanos para determinar la eficacia in vivo de las moléculas de ejemplo dirigidas a células de la presente invención en ratones portadores de tumores humanos. Las células tumorales humanas que expresan constitutivamente luciferasa y muestran la expresión en la superficie celular del objetivo del scFv- (n) apropiado se usan en este modelo de xenoinjerto. Los procedimientos conocidos por el experto en la materia se usan para probar la citotoxicidad dirigida de las moléculas de la presente invención (véase, por ejemplo, WO 2014/164680, WO 2014/164693, WO 2015/191764). Ciertas moléculas de reconocimiento celular de la presente invención son capaces de reducir significativamente la carga tumoral humana en ratones desafiados con células tumorales humanas.

[0855] Como se muestra en los Ejemplos 1-4, los polipéptidos efectores de la subunidad A de la toxina Shiga de combinación de la presente invención pueden usarse como andamios para crear moléculas de reconocimiento celular que exhiben: 1) mayor estabilidad, 2) tolerabilidad mejorada in vivo en cordados, 2) potencial inmunogénico

reducido después de la administración a cordados, y/o la capacidad de administrar un epítipo de células T integrado o insertado para la presentación de MHC de clase I por una célula cordada nucleada. En ciertas combinaciones, el nivel resultante de desinmunización representa la acción sinérgica de subregiones desinmunizadas individualmente que se combinaron entre sí.

5

**Ejemplo 4. Una molécula de reconocimiento celular de ejemplo que reconoce células CD38 +**

[0856] Las características de unión de la proteína "SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1" (SEQ ID NO: 82) a un objetivo CD38 humano extracelular se determinaron mediante un ensayo de citometría de flujo basado en fluorescencia. Las muestras que contenían células CD38 positivas (CD38 +) (de la línea celular A o F) se suspendieron en 1X PBS que contenía un 1 por ciento de albúmina de suero bovino (BSA) (Calbiochem, San Diego, CA, EE. UU.), En lo sucesivo denominado "1X PBS + 1% de BSA ", y se incubó durante una hora a 4 ° C con 100 μL de varias diluciones de SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1. Las concentraciones más altas de SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 probadas en el ensayo se seleccionaron para saturar todas las posibilidades de unión. Las células CD38 negativas (CD38-) (de las líneas celulares H e I) se trataron con la concentración más alta de SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 probadas en células positivas objetivo en este ensayo. 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 una hora a 4 ° C con 100 μL de 1X PBS + 1% BSA que contenía α-SLT-1A pAb1, a continuación se lavaron nuevamente y se incubaron durante una hora a 4 ° C con 100 μL de 1X PBS + 1 Solución de% BSA que contiene un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

25

[0857] Las muestras celulares se lavaron 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 para analizar el porcentaje de células unidas por suficiente anticuerpo secundario, indicativo de los niveles de unión de SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 a las células en cada muestra. Los datos para todas las muestras en unidades de intensidad de fluorescencia media (MFI), en unidades de fluorescencia relativa, se obtuvieron compilando los datos utilizando una muestra de control negativo de células que no se trató con ninguna molécula de reconocimiento celular pero que se incubó con el α - SLT-1A pAb1 anticuerpo primario y el anticuerpo secundario anti-conejo como se describió anteriormente. El MFI integrado (iMFI) se calculó multiplicando el porcentaje de células positivas con el MFI. Se trazaron gráficos de iMFI versus "concentración de proteína" en nanomolar usando el software Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Usando la función de software Prism de unión de un sitio  $[Y = B_{max} * X / (K_D + X)]$  bajo el encabezado de saturación de unión, se calcularon  $B_{max}$  y  $K_D$  utilizando datos corregidos de línea de base.  $B_{max}$  es el enlace específico máximo informado en iMFI.  $K_D$  es la constante de unión de equilibrio, informada en nanomolar.

35

[0858] La  $B_{max}$  para SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 (SEQ ID NO: 82) que se une a dos tipos de células CD38 + diferentes se midió en aproximadamente 100,000 iMFI, y la  $K_D$  de SLT- 1A-combinación7::αCD38-scFv-1 que une esas células CD38 + se midió en aproximadamente 2-7 nM (Tabla 19; Figura 18). SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 no exhibió unión específica a las células CD38 o unión de alta afinidad a las células CD38 en este ensayo en las condiciones descritas (Figura 18).

40

**Tabla 19.** Características de unión: valores representativos para  $B_{max}$  y  $K_D$  para la unión celular por una molécula de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención

Molécula de reconocimiento celular	línea celular A positiva de la diana		línea celular F positiva de la diana	
	$B_{max}$ (MFI)	$K_D$ (nM)	$B_{max}$ (MFI)	$K_D$ (nM)
<b>SLT-1A-combinación7::αCD38-scFV-1</b>	112.660	7,1	93.966	1,6

45

[0859] Se probó la actividad catalítica de la molécula SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 de ejemplo dirigida a CD38, como se describe en el Ejemplo 2. SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 (SEQ ID NO: 82) exhibió actividad de inactivación de ribosomas comparable a un tipo salvaje.

50

[0860] Se probó la citotoxicidad de la molécula SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 de ejemplo dirigida a CD38, como se describe en el Ejemplo 2. SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 (SEQ ID NO: 82) fue potente citotóxico para las células CD38 +.

55

[0861] La molécula de ejemplo dirigida a CD38, de reconocimiento celular SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 se probó por inmunogenicidad reducida como se describe en el Ejemplo 2. SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 (SEQ ID NO: 82) exhibió inmunogenicidad reducida en comparación con un control SLT-1A-FR::αCD38-scFv-1.

[0862] La molécula de ejemplo dirigida a CD38, de reconocimiento celular SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 se probó en un modelo de xenoinjerto de cáncer humano usando células humanas que expresan CD38 y un ensayo

5 conocido por el experto (ver por ejemplo, WO 2014/164693). SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 (SEQ ID NO: 82) exhibió la capacidad de reducir la carga tumoral en ratones inyectados con células neoplásicas positivas para CD38 en comparación con un grupo de control, tratado con vehículo. En este estudio, se inyectó a los ratones 2,5 x 10<sup>6</sup> células Daudi-Luc (una línea de células tumorales positivas para CD38 humanas que se ha diseñado para expresar el gen de la luciferasa). Cuatro días después de la inyección del tumor, los ratones se aleatorizaron en grupos de ocho ratones por grupo y se inició el tratamiento. Los ratones en los grupos de control y de tratamiento de la molécula de reconocimiento celular recibieron solo vehículo o molécula de reconocimiento celular, respectivamente, durante doce dosis durante cinco semanas (tres veces por semana durante dos semanas, una semana sin dosificación y a continuación tres veces por semana nuevamente durante 2 semanas). En diferentes días del estudio, se midió la bioluminiscencia de todo el cuerpo (BLI) en fotones por segundo para controlar la carga tumoral a lo largo del tiempo mediante la detección de células Daudi que expresan luciferasa. Antes del tratamiento, los ratones se aleatorizaron usando sus lecturas BLI para crear grupos de ratones con valores BLI medios y medianas similares. Los resultados de este estudio se informan en la Tabla 20 y la Figura 19. La Tabla 20 enumera la mediana de la señal BLI para el grupo tratado con la molécula de reconocimiento celular y el grupo de control de solo vehículo y el porcentaje de "tratado sobre el control" (% T/C), definido por la fórmula: (señal BLI media del grupo tratado)/(señal BLI mediana del grupo de control solo para vehículo) x 100. El día 4 incluyó mediciones previas al tratamiento.

20 **Tabla 20.** Tratamiento con la molécula de reconocimiento celular de ejemplo SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 redujo las cargas tumorales in vivo

Día de estudio	Grupo de tratamiento		SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1
	molécula de reconocimiento celular	sólo vehículo	
	Mediana de la señal BLI (fotones/segundo)		Porcentaje de BLI de la molécula de reconocimiento celular tratada sobre el control tratado (% T/C)
4	1,37e6	1,46e6	94%
7	1,64e6	2,10e6	78%
14	7,66e6	9,36e7	8%
22	3,60e8	4,22e9	9%
28	1,88e9	9,32e9	20%
35	1,24e10	3,26e10	38%
40	1,65e10	1,55e11	11%

25 [0863] Las mediciones de BLI tomadas en los días 7, 14, 22, 36 y 40 del estudio mostraron que el grupo de control, solo para vehículos, tenía una carga tumoral más alta que el grupo tratado con 0.5 miligramos de SLT-1A-combinación7::αCD38- scFv-1 por kg de peso corporal por dosis. En el momento final (Día 40), el porcentaje de BLI para el tratamiento sobre el control solo del vehículo (T/C) fue del 11%, lo que indica que hubo una reducción del 89% de la carga tumoral media en el grupo tratado con SLT-1A-combinación7::αCD38-scFv-1 (SEQ ID NO: 82).

30 **Ejemplo 5. Moléculas de reconocimiento celular que comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención unido a una región de unión a HER2 (αHER2-V<sub>H</sub>H fusionada con SLT-1A-combinación (n))**

35 [0864] En este ejemplo, cualquiera de los polipéptidos efectores de toxina Shiga SLT-1A-combinación0-26, como se describió anteriormente, está operativamente unido a una región de unión a inmunoglobulina anti-HER2, que se une específicamente y con alta afinidad a un extracelular antígeno en HER2 humano, tal como la región variable de dominio único del camélido, anticuerpo 5F7 (αHER2-V<sub>H</sub>H) como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de EE. UU. 2011/59,090, para formar una molécula de ejemplo de reconocimiento celular de la presente invención.

40 Construcción, producción y purificación de la proteína de fusión citotóxica de unión a HER2 "SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H"

45 [0865] Para ciertas realizaciones, la región de unión derivada de inmunoglobulina αHER2-V<sub>H</sub>H y el polipéptido efector de toxina Shiga se fusionan para formar un único polipéptido continuo "SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H." En este ejemplo, un polinucleótido que codifica αHER2-V<sub>H</sub>H, una región de unión que comprende un dominio variable V<sub>H</sub>H derivado de la inmunoglobulina 5F7, se clona en marco con un polinucleótido que codifica un enlazador conocido en la técnica y en marco con un codificador de polinucleótido el polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n). La expresión de la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H se logra usando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células conocidos

por el experto y/o como se describe en el artículo anterior ejemplos

Determinación de las características in vitro de SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H

5 [0866] Las características de unión de la molécula de reconocimiento celular de este ejemplo para las células HER2 + y las células HER2- se determinan mediante una citometría de flujo basada en fluorescencia. La B<sub>max</sub> para SLT-1A-combinación (n)::células αHER2-V<sub>H</sub>H a HER2 + se mide en aproximadamente 50,000-200,000 MFI con una K<sub>D</sub> dentro del rango de 0.01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a las células HER2 en este ensayo.

10 [0867] Las capacidades de inactivación de ribosomas de la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H se determinan en una traducción de proteínas in vitro sin células como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula de reconocimiento celular de este ejemplo sobre la síntesis de proteínas libres de células es significativo. La IC<sub>50</sub> de SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células es aproximadamente 0.1-100 pM.

15 Determinación de la citotoxicidad de SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H usando un ensayo de muerte celular HER2 +

[0868] Las características de citotoxicidad de SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H se determinan mediante el ensayo general de destrucción celular como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores usando células HER2 +. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H se determinan mediante el mismo ensayo general de destrucción de células usando células HER2 en comparación con las células HER2 +. El CD50 de la molécula de reconocimiento celular de este ejemplo es aproximadamente 0.01-100 nM para las células HER2 + dependiendo de la línea celular. El CD<sub>50</sub> de SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H es aproximadamente 10-10,000 veces mayor (menos citotóxico) para las células que no expresan HER2 en una superficie celular en comparación con las células que expresan HER2 en una célula superficie. Además, la citotoxicidad de SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H se investiga tanto para la citotoxicidad directa como para la citotoxicidad indirecta por el suministro y la presentación del epítipo de células T que conducen a la citotoxicidad mediada por CTL utilizando ensayos conocidos por los expertos. trabajador y/o descrito aquí.

30 Determinación de los efectos in vivo de la molécula de ejemplo SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H utilizando modelos animales

[0869] Se usan modelos animales para determinar los efectos in vivo de la molécula de reconocimiento celular SLT-1A-combinación (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H hacia las células neoplásicas. Se usan varias cepas de ratones para probar el efecto del combinación SLT-1A (n)::αHER2-V<sub>H</sub>H 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 células superficies La muerte celular se investiga tanto para la citotoxicidad directa como para la citotoxicidad indirecta mediante la administración y presentación de epítipos de células T que conducen a la citotoxicidad mediada por CTL usando ensayos conocidos por el experto en la materia y/o descritos aquí.

40 **Ejemplo 6. Moléculas de reconocimiento celular que comprenden un polipéptido efector de subunidad A de toxina Shiga de la presente invención, un péptido-epítipo de células T fusionado y una región de unión a ligando específica para IL-2R**

45 [0870] En este ejemplo, el polipéptido efector de la toxina Shiga se deriva de la subunidad A de la toxina similar a Shiga 1 (SLT-1A) como se describió anteriormente, opcionalmente con sustituciones de residuos de aminoácidos que confieren resistencia a la escisión por furina, tales como, por ejemplo, R248A/R251A (véase el Ejemplo 3, supra). Se selecciona un péptido-epítipo de células T CD8 + humanas basándose en predicciones de unión a moléculas de MHC I, tipos de HLA, inmunogenicidades ya caracterizadas y reactivos fácilmente disponibles como se describe anteriormente, tales como el epítipo GVMTRGRLK (SEQ ID NO: 560). Una región de unión se deriva de un ligando (la citocina interleucina 2 o IL-2) para el receptor de interleucina 2 humano (IL-2R), que es capaz de unirse específicamente a una parte extracelular de la IL-2R humana. IL-2R es un receptor de la superficie celular expresado por varios tipos de células inmunes, como las células T y las células asesinas naturales.

55 Construcción, producción y purificación de las proteínas de fusión de reconocimiento celular T-epítipo::SLT-1A::IL-2 e IL-2::T-epítipo::SLT-1A

[0871] La región de unión de tipo ligando αIL-2R, el polipéptido efector de toxina Shiga y el epítipo de células T se unen para formar un único polipéptido continuo, tal como "epítipo T::SLT-1A::IL-2" o "IL-2::T-epítipo::SLT-1A", y, opcionalmente, se agrega un KDEL al extremo carboxi terminal del polipéptido resultante. Por ejemplo, las proteínas de fusión se producen expresando a partir de polinucleótidos que codifican T-epítipo::SLT-1A::IL-2 e IL-2::T-epítipo::SLT-1A. La expresión del T-epítipo::SLT-1A::IL-2 o IL-2::T-epítipo::SLT-1A se dirige a las moléculas de reconocimiento celular utilizando sistemas de traducción de proteínas libres de células y/o bacterianas como descrito en los ejemplos anteriores.

65

Determinación de las características in vitro de las moléculas de orientación celular SLT-1A::T-epitopo::IL-2 e IL-2::SLT-1A::T-epitopo

5 [0872] Las características de unión de las moléculas de reconocimiento celular de este ejemplo para células positivas para IL-2R y células negativas para IL-2R se determinan mediante citometría de flujo basada en fluorescencia. La B<sub>max</sub> para ambos epítopos T::SLT-1A::IL-2 e IL-2::epitopo T::células positivas para SLT-1A a IL-2R se mide en aproximadamente 50,000-200,000 MFI con una K<sub>D</sub> dentro del rango de 0.01-100 nM, mientras que no hay una unión significativa a las células negativas para IL-2R en este ensayo.

10 [0873] Las capacidades de inactivación de ribosomas del epítipo T::SLT-1A::IL-2 e IL-2::epítipo T::SLT-1A se determinan en una traducción de proteínas in vitro sin células como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de las moléculas de reconocimiento celular de este ejemplo en la síntesis de proteínas libres de células es significativo. Para ambos T-epitopo::SLT-1A::IL-2 e IL-2::T-epitopo::SLT-1A, el IC<sub>50</sub> de la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es aproximadamente 0.1-100 pM.

15 Determinación de la citotoxicidad de las moléculas que se dirigen a las células Epítipo T::SLT-1A::IL-2 o IL-2::Epítipo T::SLT-1A utilizando un ensayo de destrucción celular

20 [0874] Las características de citotoxicidad de T-epitopo::SLT-1A::IL-2 o IL-2::T-epitopo::SLT-1A se determinan mediante el ensayo general de destrucción celular como se describe anteriormente en los ejemplos anteriores utilizando células positivas para IL-2R. Además, las características de citotoxicidad selectiva de T-epitopo::SLT-1A::IL-2 o IL-2::T-epitopo::SLT-1A se determinan mediante el mismo ensayo general de destrucción celular usando IL-2R negativo células como comparación con las células positivas para IL-2R. El CD<sub>50</sub> de las moléculas de reconocimiento celular de este ejemplo es aproximadamente 0.01-100 nM para células positivas para IL-2R dependiendo de la línea celular. El CD<sub>50</sub> de T-epitopo::SLT-1A::IL-2 o IL-2::T-epitopo::SLT-1A es aproximadamente 10-10,000 veces mayor (menos citotóxico) para las células que no expresan IL-2R en una superficie celular en comparación con las células que expresan IL-2R en una superficie celular. Además, la citotoxicidad del epítipo T::SLT-1A::IL-2 o IL-2::epítipo T::SLT-1A se investiga tanto para la citotoxicidad directa como para la citotoxicidad indirecta mediante la administración y presentación del epítipo de células T que conduce a la citotoxicidad mediada por CTL usando ensayos conocidos por el experto en la materia y/o descritos aquí.

Determinación de los efectos in vivo de las moléculas que apuntan a las células T-epitopo::SLT-1A::IL-2 o IL-2::T-epitopo::SLT-1A Uso de modelos animales

35 [0875] Los modelos animales se usan para determinar los efectos in vivo de las moléculas de reconocimiento celular T-epítipo::SLT-1A::IL-2 e IL-2::T-epítipo::SLT-1A en células neoplásicas. Se usan varias cepas de ratones para probar el efecto del T-epítipo::SLT-1A::IL-2 e IL-2::T-epítipo::SLT-1A después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones resultantes de la inyección en aquellos ratones de células neoplásicas humanas que expresan IL-2R en sus superficies celulares. La muerte celular se investiga tanto para la citotoxicidad directa como para la citotoxicidad indirecta mediante la administración y presentación del epítipo de células T que conduce a la citotoxicidad mediada por CTL usando ensayos conocidos por el experto en la materia y/o descritos aquí.

**Ejemplo 7. Moléculas de reconocimiento celular que comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga de la presente invención unido a una región de unión CEA (región de unión a CEA-(Fn3) fusionada con SLT-1A-combinación (n))**

45 [0876] En este ejemplo, el polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n), como se describió anteriormente, está operativamente unido a una región de unión anti-CEA (Fn3) de región de unión de tipo inmunoglobulina, que se une específicamente y con alta afinidad a un antígeno extracelular en el antígeno carcinoembrionario humano (CEA), tal como la décima región de unión derivada del dominio de fibronectina tipo III C743 como se describe en Pirie C et al., J Biol Chem 286: 4165-72 (2011), a formar una molécula de ejemplo de reconocimiento celular de la presente invención. Además, un epítipo inmunogénico de células T CD8 + se fusiona con el extremo amino del polipéptido efector de toxina Shiga de este ejemplo para formar el combinación epítipo-SLT-1A (n).

Construcción, producción y purificación de la proteína de fusión citotóxica, de unión a CEA "αCEA- (Fn3) fusionada con el epítipo-SLT-1A-combinación (n)"

55 [0877] Para ciertas realizaciones, la región de unión de tipo inmunoglobulina αCEA- (Fn3) y el polipéptido efector de toxina Shiga se fusionan para formar un único polipéptido continuo "αCEA- (Fn3) fusionado con el epítipo-SLT-1A-combinación (n)". En este ejemplo, una proteína de fusión "αCEA- (Fn3) fusionada con epítipo-SLT-1A-combinación (n)" se diseña y produce como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características in vitro de "αCEA- (Fn3) fusionado con epítipo-SLT-1A-combinación (n)"

65

[0878] Las características de unión de la molécula de reconocimiento celular de este ejemplo para células CEA + y células CEA- se determinan mediante una citometría de flujo basada en fluorescencia. La  $B_{max}$  para  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionada con epítipo-SLT-1A-combinación (n) a las células CEA + es de aproximadamente 50,000-200,000 MFI con una  $K_D$  dentro del rango de 0.01-100 nM, mientras que no hay unión significativa a las células CEA en este ensayo.

[0879] Las capacidades de inactivación de ribosomas de la  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionada con el epítipo-SLT-1A-combinación (n) molécula de reconocimiento celular se determina en una traducción de proteínas in vitro sin células como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula de reconocimiento celular de este ejemplo sobre la síntesis de proteínas libres de células es significativo. La  $IC_{50}$  de  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionada con epítipo-SLT-1A-combinación (n) en la síntesis de proteínas en este ensayo libre de células es aproximadamente 0.1-100 pM.

Determinación de la citotoxicidad de " $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionado con epítipo-SLT-1A-combinación (n)" usando un ensayo de eliminación de células CEA +

[0880] Las características de citotoxicidad de  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionado con epítipo-SLT-1A-combinación (n) se determinan mediante el ensayo general de destrucción celular como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores usando células CEA +. Además, las características de citotoxicidad selectiva de  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionadas con epítipo-SLT-1A-combinación (n) se determinan mediante el mismo ensayo general de destrucción celular usando células CEA- como comparación con las células CEA +. El  $CD_{50}$  de la molécula de reconocimiento celular de este ejemplo es aproximadamente 0.01-100 nM para células CEA + dependiendo de la línea celular. El  $CD_{50}$  de  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionado con epítipo-SLT-1A-combinación (n) es aproximadamente 10-10,000 veces mayor (menos citotóxico) para las células que no expresan CEA en una superficie celular en comparación con las células que expresan CEA en una superficie celular. Además, la citotoxicidad de  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionado con el epítipo-SLT-1A-combinación (n) se investiga tanto para la citotoxicidad directa como para la citotoxicidad indirecta mediante la administración y presentación del epítipo de células T que conduce a la citotoxicidad mediada por CTL usando ensayos conocidos por el trabajador calificado y/o descrito aquí.

Determinación de los efectos in vivo de la molécula de ejemplo de reconocimiento celular " $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionada con epítipo-SLT-1A-combinación (n)" Uso de modelos animales

[0881] Los modelos animales se usan para determinar los efectos in vivo de la molécula de reconocimiento celular  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionada con el epítipo-SLT-1A-combinación (n) hacia las células neoplásicas. Se usan varias cepas de ratones para probar el efecto de  $\alpha$ CEA- (Fn3) fusionado con epítipo-SLT-1A-combinación (n) después de la administración intravenosa en tumores de xenoinjerto en ratones que resultan de la inyección en esos ratones de células neoplásicas humanas que expresan CEA en sus superficies celulares. La muerte celular se investiga tanto para la citotoxicidad directa como para la citotoxicidad indirecta mediante la administración y presentación de epítopos de células T que conducen a la citotoxicidad mediada por CTL usando ensayos conocidos por el experto en la materia y/o descritos aquí.

**Ejemplo 8. Moléculas citotóxicas de reconocimiento celular que comprenden un polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación (n) y el antígeno ahelmintho-intestinal del anticuerpo**

[0882] En este ejemplo, cualquiera de los polipéptidos efectores de toxina Shiga SLT-1A-combinación 0-26, como se describe anteriormente, está operativamente unido a una región de unión de tipo inmunoglobulina dirigida a un antígeno helminto. Una región de unión de tipo inmunoglobulina ahelmintho-intestinal-antigen se deriva de un anticuerpo generado, utilizando técnicas conocidas en la técnica, para el ortólogo de helmintos de un receptor de transferrina humano (véase, por ejemplo, el gen de nematodos gcp-2.1 UniProt G8JYE4\_CAEEL; Rosa B et al. ., Mol Cell Proteomics M114.046227 (2015)).

Construcción, producción y purificación de la molécula citotóxica de reconocimiento celular " $\alpha$ Helminth-Intestinal-Antigen"

[0883] La región de unión del tipo de inmunoglobulina ahelmintho-intestinal-antígeno y la región efectora de la toxina Shiga, que opcionalmente es una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión de la proteasa, se unen para formar una proteína en la que la región de unión del tipo inmunoglobulina no es situado proximal 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 una proteína de unión al antígeno intestinal de helminto fusionado a un combinación SLT-1A-amino amino-terminal 0-26. La expresión de la proteína SLT-1A-combinación (n)::ahelmintho-intestinal-antigen vinculante se logra utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características in vitro de la molécula citotóxica de reconocimiento celular SLT-1A-combinación (n)::antígeno de helminto-intestinal

[0884] Las características de unión de la molécula citotóxica de reconocimiento celular 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-1A:: $\alpha$ helminth-intestinal-antigen y/o SLT-1A-FR:: $\alpha$ helminth-intestinal-antigen to target protein se mide en aproximadamente 100 nM, mientras que no hay una unión significativa a un control negativo proteína (p. ej., ortólogo de helmintos purificado, recombinante del receptor de transferrina humana) en este ensayo.

[0885] Las capacidades de inactivación de ribosomas del SLT-1A:: $\alpha$ helminth-intestinal-antigen se determinan en una traducción de proteínas in vitro sin células como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de reconocimiento celular de este ejemplo sobre la síntesis de proteínas libres de células es significativo. La  $IC_{50}$  del SLT-1A::antígeno de 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 molécula citotóxica de reconocimiento celular SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Helminth-Intestinal-Antigen

[0886] La toxicidad de SLT-1A:: $\alpha$ helminth-intestinal-antígeno a los helmintos se determina usando helmintos modelo (véase, por ejemplo Iatsenko I et al., Toxinas 2050-63 (2014)). El helminto se puede administrar SLT-1A::antígeno de helminto-intestino purificado mediante remojo o, alternativamente, alimentando el helminto con bacterias que expresan la proteína de fusión SLT-1A:: $\alpha$ helminto-antígeno intestinal.

[0887] Además, a los animales de laboratorio que albergan helmintos y/o que muestran enfermedades relacionadas con helmintos se les administra SLT-1A::antígeno intestinal de helminto y se monitorea la reducción o eliminación de helmintos y/o síntomas asociados de helmintos parásitos.

#### **Ejemplo 9. Moléculas de reconocimiento celular que comprenden un polipéptido efector de toxina Shiga SLT-1A-combinación (n) fusionado a una región de unión de tipo inmunoglobulina específica para Gag de VIH-1**

[0888] En este ejemplo, cualquiera de los polipéptidos efectores de la toxina Shiga SLT-1A-combinación0-26, como se describe anteriormente, está operativamente unido a un antígeno  $\alpha$ Gag de la región de unión de tipo inmunoglobulina, que se deriva de un dominio de tipo inmunoglobulina Reconociendo la poliproteína Gag de la proteína de la cápside del VIH HIV-1 (véase, por ejemplo, Nagola S et al., Retrovirology 9: 17 (2012)) y que comprende un polipéptido artificial de repetición del dominio Ankyrin capaz de unirse a una parte extracelular de Gag. La mordaza es la principal proteína estructural involucrada en el ensamblaje del virus del VIH y se oligomeriza en una red de hasta 700 a 5000 copias por virión para formar un núcleo CA con forma cónica (ver, por ejemplo, Chen Y et al., Biophys J 96: 1961-9 (2009); Pornillos O et al., Nature 469: 424-7 (2011)).

#### Construcción, producción y purificación de las moléculas de orientación celular "SLT-1A-combinación (n) vinculado a $\alpha$ Gag"

[0889] El tipo inmunoglobulina región de unión  $\alpha$ Gag y Shiga toxina polipéptido efector SLT-1A-combinación (n) se fusionan para formar una proteína citotóxica. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce al expresar un polinucleótido que codifica la proteína de unión al antígeno  $\alpha$ Gag SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag. La expresión de la proteína citotóxica SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag se logra utilizando sistemas de traducción de proteínas bacterianos y/o libres de células como se describe en los ejemplos anteriores.

#### Determinación de las características in vitro de la molécula de orientación celular "SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag"

[0890] Las características de unión de la proteína citotóxica de este ejemplo para Gag de VIH-1 recombinante purificada se determinan mediante un ensayo conocido en la técnica, tal como un ensayo inmunosorbente ligado a enzima. La  $K_D$  para SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag que se une a Gag se mide aproximadamente dentro del rango de 0.01-100 nanomolar (nM).

[0891] Las capacidades de inactivación de ribosomas de la proteína citotóxica combinación SLT-1A (n):: $\alpha$ Gag 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  $IC_{50}$  de SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células es aproximadamente 0.1-100 pM.

#### Determinación de la citotoxicidad de la molécula de reconocimiento celular "SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag" utilizando un ensayo de destrucción celular

[0892] Las características de citotoxicidad de SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag se determinan mediante el ensayo general de destrucción celular como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores usando células T

humanas infectadas con VIH. Además, las características de citotoxicidad selectiva de SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag se determinan mediante el mismo ensayo general de destrucción de células usando células T no infectadas en comparación con las células T infectadas. El  $CD_{50}$  de la proteína citotóxica de este ejemplo es de aproximadamente 0.01-100 nM para las células T infectadas con virus de replicación activa. El  $CD_{50}$  de la proteína citotóxica es aproximadamente 10-10.000 veces mayor (menos citotóxico) para las células T no infectadas.

Determinación de los efectos in vivo de la molécula citotóxica de reconocimiento celular "SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag" Uso de modelos animales

[0893] El uso de SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag para inhibir la progresión de la infección por VIH se prueba administrando SLT-1A-combinación (n):: $\alpha$ Gag a virus de inmunodeficiencia simia (SIV) no humanos infectados primates (véase Sellier P et al., PLoS One 5: e10570 (2010)).

**Ejemplo 10. Molécula citotóxica de reconocimiento celular derivada de la subunidad A de la toxina Shiga y el antígeno de alfavir de histoplasma del anticuerpo**

[0894] En este ejemplo, cualquiera de los polipéptidos efectores de toxina Shiga SLT-1A-combinación0-26, como se describe anteriormente, está operativamente unido a un antígeno de histoplasma de región de unión de tipo inmunoglobulina, que se deriva de un anticuerpo conocido o un anticuerpo generado, usando técnicas conocidas en la técnica, contra un antígeno de superficie Histoplasma capsulatum (véase, por ejemplo, antígeno H. capsulatum H (Deepe G, Durose G, Infect Immun 63: 3151-7 (1995)) y el mAb H1C (Lopes L et al., Clin Vaccine Immunol 17: 1155-8 (2010); H. capsulatum, superficie celular, proteína similar a histona H2B (Nosanchuk J et al., J Clin Invest 112: 1164-1175 (2003))).

Construcción, producción y purificación de la molécula citotóxica de reconocimiento celular SLT-1A-combinación (n)::antígeno de histoplasma

[0895] La región de unión del tipo de inmunoglobulina *helminth-intestinal-antigen* y el polipéptido efector de la toxina Shiga, que opcionalmente es una región efectora de la toxina Shiga resistente a la escisión de la proteasa, se unen para formar una proteína en la que la región de unión del tipo de inmunoglobulina no es situado cerca del extremo amino de la proteína en comparación con el polipéptido efector de la toxina Shiga. Por ejemplo, una proteína de fusión se produce al expresar un polinucleótido que codifica una proteína de unión al antígeno de la superficie de Histoplasma fusionada a un combinación SLT-1A amino-terminal (n). La expresión del combinación SLT-1A (n)::proteína de unión al antígeno de histoplasma se logra usando sistemas de traducción de proteínas libres de células y/o bacterianos como se describe en los ejemplos anteriores.

Determinación de las características in vitro de la molécula citotóxica de reconocimiento celular SLT-1A-combinación (n)::Antígeno de histoplasma

[0896] Las características de unión de la molécula citotóxica de reconocimiento celular 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-1A-combinación (n):: $\alpha$ Histoplasma-antigen to protein (por ejemplo, un antígeno de superficie de H. capsulatum purificado, recombinante) se mide en aproximadamente 100 nM, mientras que no hay una unión significativa a un negativo control de proteínas en este ensayo.

[0897] Las capacidades de inactivación de ribosomas del combinación SLT-1A-n (n)::proteína citotóxica de antígeno de histoplasma se determinan en una traducción de proteína in vitro libre de células como se describió anteriormente en los ejemplos anteriores. El efecto inhibitorio de la molécula citotóxica de reconocimiento celular de este ejemplo sobre la síntesis de proteínas libres de células es significativo. La  $IC_{50}$  del combinación SLT-1A (n)::antígeno de histoplasma en la síntesis de proteínas en este ensayo sin células es de aproximadamente 0.1-100 pM.

Determinación de la actividad antifúngica de la molécula citotóxica de reconocimiento celular SLT-1A-combinación (n)::Antígeno de histoplasma usando hongos

[0898] Se determina la actividad fungicida del combinación SLT-1A (n)::antígeno de histoplasma para células fúngicas. Purificado, StxA:: $\alpha$ Histoplasma-antigen y/o StxA-FR:: $\alpha$ Histoplasma-antigen se administra directamente a cultivos fúngicos para medir la actividad fungicida (ver, por ejemplo, Li R et al., Antimicrob Agents Chemother 44: 1734-6 (2000)). Además, a los animales de laboratorio infectados con hongos (p. Ej. H. capsulatum) y/o que muestran histoplasmosis, micosis sistémicas y/u otras enfermedades relacionadas con H. capsulatum se les administra SLT-1A-combinación (n)::antígeno de histoplasma y se monitorea para la reducción o eliminación de patógenos fúngicos y/o síntomas asociados de infecciones fúngicas (véase, por ejemplo, Kobayashi G et al., Antimicrob Agents Chemother 34: 524-8 (1990)).

**Ejemplo 11. Moléculas de reconocimiento celular citotóxicas que reconocen varios tipos de células**



[0899] En este ejemplo, la región efectora de la toxina Shiga se deriva de la subunidad A de la toxina 1 tipo Shiga (SLT-1A), la toxina Shiga (StxA) y/o la toxina 2 tipo Shiga (SLT-2A) tales que comprende una combinación de subregiones descritas en el presente documento para proporcionar dos o más de los siguientes: 1) desinmunización, 2) resistencia a la escisión de proteasas, y/o 3) un epítipo de células T heterólogo integrado o insertado. Una región de unión se deriva de las moléculas elegidas de la columna 1 de la Tabla 21 y que se une a la biomolécula diana extracelular indicada en la columna 2 de la Tabla 21. La combinación resultante, los polipéptidos efectores de la toxina Shiga y las regiones de unión se fusionan entre sí a partir de varios polipéptidos de cadena. Las proteínas de ejemplo de este ejemplo se crean opcionalmente con un motivo señal de tipo KDEL carboxilo terminal usando técnicas conocidas en la técnica y opcionalmente unidas a un material exógeno adicional, tal como un agente o agentes promotores de detección. Las proteínas de ejemplo de este ejemplo se 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 marcar compartimentos subcelulares de células diana y para diagnosticar y tratar enfermedades, afecciones y/o trastornos indicados en la columna 3 de la Tabla 21.

15 **Tabla 21. Diversas regiones de unión para el reconocimiento celular de proteínas citotóxicas**

Fuente de 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 $\alpha$ 4	trastornos autoinmunes, tales como esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn
obinutuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ocaratuzumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ocrelizumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
ofatumumab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes

palivizumab	Proteína F del virus sincitial respiratorio	tratar el virus sincitial respiratorio
panitumumab	EGFR	varios cánceres, tales como cáncer colorectal y cáncer de cabeza y cuello
pertuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
pro 140	CCR5	infección por VIH y trastornos de células T
ramucirumab	VEGFR2	varios cánceres y trastornos relacionados con cáncer, tales como tumores sólidos
rituximab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
tocilizumab o atlizumab	receptor de IL-6	trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide
tositumomab	CD20	cánceres de células B, tales como linfoma y leucemia, y trastornos inmunitarios relacionados con células B, tales como trastornos autoinmunes
trastuzumab	HER2/neu	varios cánceres y tumores, tales como cáncer de mama y cáncer colorectal
ublrituximab	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 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	CD56	trastornos inmunitarios y varios cánceres, tales

monoclonales de unión a CD56		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))
adalimumab	TNF- $\alpha$	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis en placas, artritis psoriática, espondilitis anquilosante, artritis idiopática juvenil, enfermedad hemolítica del recién nacido
afelimomab	TNF- $\alpha$	varios cánceres y trastornos inmunitarios
ald518	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
anrukinzumab o ima-638	IL-13	varios cánceres y trastornos inmunitarios
briakinumab	IL-12, IL-23	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como psoriasis, artritis reumatoide, enfermedades inflamatorias del intestino esclerosis múltiple
brodalumab	IL-17	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedades inflamatorias

canakinumab	IL-1	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
certolizumab	TNF- $\alpha$	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedad de Crohn
fezakinumab	IL-22	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, psoriasis
ganitumab	IGF-I	varios cánceres
golimumab	TNF- $\alpha$	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, artritis psoriática, espondilitis anquilosante
infliximab	TNF- $\alpha$	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriática, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa
ixekizumab	IL-17A	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como enfermedades autoinmunes
mepolizumab	IL-5	varios trastornos inmunitarios y cánceres, tales como cánceres de células B
nerelimomab	TNF- $\alpha$	varios cánceres y trastornos inmunitarios
olokizumab	IL6	varios cánceres y trastornos inmunitarios
ozoralizumab	TNF- $\alpha$	inflamación
perakizumab	IL17A	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis
placulumab	TNF humano	varios trastornos inmunitarios y cánceres
sarilumab	IL6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante
siltuximab	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios,
sirukumab	IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
tabalumab	BAFF	cánceres de células B
ticilimumab o tremelimumab	CTLA-4	varios cánceres
tildrakizumab	IL23	trastornos inflamatorios mediados inmunológicamente
tnx-650	IL-13	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como cánceres de células B
tocilizumab o atlizumab	receptor de IL-6	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como artritis reumatoide
ustekinumab	IL-12, IL-23	varios cánceres y trastornos inmunitarios, tales como esclerosis múltiple, psoriasis, artritis psoriática
Varios factores de crecimiento: VEGF, EGF1, EGF2, FGF	VEGFR, EGFR, FGFR	varios cánceres, tales como cáncer de mama y cáncer de colon, y para inhibir la vascularización
Varias citoquinas: IL-2, IL-6, IL-23, CCL2, BAFFs, TNFs, RANKL	IL-2R, IL-6R, IL23R, CD80/CD86, TNFRSF13/TNFRSF17, TNFR	varios trastornos inmunitarios y cánceres
Anticuerpos ampliamente neutralizantes identificados de muestras de pacientes	Antígeno de la superficie de la gripe (por ejemplo, hemaglutininas y proteína de matriz 2)	infecciones virales (véase, por ejemplo, Prabakaran P et al., Front Microbiol 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., Front Microbiol 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., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 109: 18030-5 (2012); Pettitt J et al., Sci Transl Med 5: 199ra113 (2013); Stahelin R, Expert Opin Ther Targets 18: 115-20 (2014); Becquart P et al., PLoS One 9: e96360 (2014); Stahelin R, Fron Microbiol 5: 300 (2014); Tran E et al., J Virol 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 la 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))

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)	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLEMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTG FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVVRGITHNKI LWDSSTLGAILMRRTISS
SEQ ID NO: 2	Subunidad A de toxina Shiga	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLEMI DSGTGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTG FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNCHHHASRVARMASDEFPSMCPADGRVVRGITHNKI LWDSSTLGAILMRRTISS
SEQ ID NO: 3	Subunidad A de toxina semejante a Shiga 2 (SLT-2A)	DEFTVDFSSQKSYVDSLNSIRSAISTPLGNISQGGVSVSVI NHVLGGNYISLNVRLDPYSERFNHLRLIMERNNLYVA GFINTETNIFYRFSDFSHISVPDVITVSMTTDSSYSSLQRIA DLERTGMQIGRHSVLSYLDLMEFRGRSMTRASSRAML RFVTVIAEALRFRQIQRGFRPALSEASPLYTMTAQDVDL TLNWGRISNVLPEYRGEDEVGRIGRISFNSLSAILGSVAVIL NCHSTGYSVRSVSQKQKTECQIVGDRAAIKVNNVLWE ANTIAALLNRKPQDLTEPNQ
SEQ ID NO: 4	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-WT	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLEMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTG FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNCHHHASRVAR
SEQ ID NO: 5	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-FR	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLEMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTG FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNCHHHASAVAA

SEQ ID NO: 6	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 0	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNRLLIVERNNLYVTG FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTNLVPMTVTVSYTTLQ RVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARA MLRFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAE DVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILG SVALILNCHHHASAVAA
SEQ ID NO: 7	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 1	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTG FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAM LRFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNCHHHASAVAA
SEQ ID NO: 8	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 2	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHASAVAA
SEQ ID NO: 9	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 3	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVNLVPMVATVGRFNNRLLIVERNNLYVT GFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQ RVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARA MLRFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAE DVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILG SVALILNCHHHASAVAA
SEQ ID NO: 10	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 4	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DNLVPMVATVVVDVRGIDPEEGRFNNRLLIVERNNLYVT GFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQ RVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARA MLRFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAE DVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILG SVALILNCHHHASAVAA
SEQ ID NO: 11	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 5	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNCHHHASRVAR
SEQ ID NO: 12	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 6	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNCHHHASRVAR

SEQ ID NO: 13	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 7	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVIFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 14	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 8	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVIFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 15	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 9	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVIFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 16	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 10	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVIFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 17	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 11	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVIFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 18	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 12	AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVIFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 19	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 13	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVIFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAELRFRQIQRGFRGILGDVFTRSYVMTAEDVD LTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVA LILNSHHHASAVAA

SEQ ID NO: 20	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 14	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLSQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 21	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 15	AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLSQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 22	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 16	KEFILDSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLSQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 23	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 17	AEFILDSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLSQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 24	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 18	AEFILDSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVNLVPMVATVGRFNNLRLIVERNNLYVT GFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQ RVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLSQSVARA MLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLLDDLSGASYVMTAE DVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILG SVALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 25	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 19	KEFILDSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDVRGIAPIEARFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLSQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLLAALSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 26	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 20	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTG VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLSQSVARAMI RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLLDDLSGRSYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHARNLVPMTAVASAVAA



SEQ ID NO: 27	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 21	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 28	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 22	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGSGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTG FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQR VAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAM LRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAED VDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGS VALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 29	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 23	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 30	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 24	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 31	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 25	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV DLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA
SEQ ID NO: 32	Polipéptido efector de la toxina Shiga SLT-1A-combinación 26	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAML RFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDV ALTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSV ALILNSHHHASAVAA

<p>SEQ ID NO: 33</p>	<p>scFv-3::SLT-1A-WT</p>	<p>MQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFSTSYNVHWV KQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSS TVYMQQLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSYVWFFDVWGA GTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASPGEKV TMTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVP ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTFGA GTKLELKEFPKPSTPPGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSL NIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGSGDNLFAVDVRGIDPE EGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNTNNVFYRFADFSHVTF PGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLD LMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTT LDDLGRSYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVR VGRISFGSINAILGSVALILNCHHHSRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 34</p>	<p>SLT-1A-FR::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRNTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETG VPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTF QGKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVPSQTLSTCTVSGFSL TTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSR LNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFV DSWGQGSVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 35</p>	<p>SLT-1A-FR::scFv-2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRNTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETG VPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTF QGKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLVPS SQTLSTCTVSGFSLTTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWR GGSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAV YYCAKSMITTFVMDSWGQGSVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 36</p>	<p>SLT-1A-FR::scFv-4</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRNTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVG DRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYS GVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF GQGTVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL EWWARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNS LRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSA</p>

<p>SEQ ID NO: 37</p>	<p>SLT-1A-FR::scFv-5</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI                  DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF                  VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA                  GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF                  VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL                  NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC                  HHHASAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVG                  DRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSG                  VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNSYPYTF                  GQGTKLEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKAS                  GYTFTSYDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQK                  FQGRVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARERIQL                  WFDYWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 38</p>	<p>SLT-1A-FR::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI                  DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF                  VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA                  GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF                  VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL                  NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC                  HHHASAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPG                  GSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPY                  GGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV                  YYCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPS                  SLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKKAPKLLIY                  SASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQY                  LYHPATEFGOGTKVEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 39</p>	<p>SLT-1A-FR::scFv-7</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI                  DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF                  VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA                  GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF                  VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL                  NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC                  HHHASAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLG                  QRATISCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAAS                  SVDSGVPARFSGSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRR                  VPYTFGGGTKLEIKGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKMS                  CKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFDNGTK                  YNEMFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQ                    AWGYPWGQGLVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 40</p>	<p>SLT-1A-FR::scFv-8</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI                  DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF                  VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA                  GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF                  VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL                  NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC                  HHHASAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQTSSLSASLG                  DRVTISCRASQDISNYLAWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSG                  VPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTF                  GCGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVLPKGG                  SLKLSCAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGG                  TTYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYC                  ARHSGYGTWGWVLFAYWGQGLVTVSA</p>

<p>SEQ ID NO: 41</p>	<p>SLT-1A-FR::scFv-9</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI                  DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF                  VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA                  GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF                  VVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDVDLTL                  NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC                  HHHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIELTQSPSSFSVSLGD                  RVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGV                  PSRFSGSGSGKDYTLTSLQTEDVATYYCQQYWSTPTFGG                  GTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSKVQLQESGPSLVQPSQRLSI                  TCTVSGFSLISYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTDY                  NAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYFCAKTLI                  TTGYAMDYWGQGTTVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 42</p>	<p>SLT-1A-WT::scFv-9</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI                  DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF                  VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA                  GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF                  VVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDVDLTL                  NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC                  HHHASRVAREFPKPKSTPPGSSGGAPDIELTQSPSSFSVSLGD                  RVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGV                  PSRFSGSGSGKDYTLTSLQTEDVATYYCQQYWSTPTFGG                  GTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSKVQLQESGPSLVQPSQRLSI                  TCTVSGFSLISYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTDY                  NAAFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYFCAKTLI                  TTGYAMDYWGQGTTVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 43</p>	<p>SLT-1A-combinación 1::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI                  DSGSGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV                  NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI                  SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT                  VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMATAEDVDLTLN                  WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH                  HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD                  RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV                  PSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQ                  GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVVRPSQTLTCTVSGFSL                  TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL                  NITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD                  SWGQGS�TVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 44</p>	<p>SLT-1A-combinación 7::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI                  DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV                  NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTSLADSSYTTLQRVAGI                  SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT                  VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMATAEDVDLTLN                  WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH                  HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD                  RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV                  PSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQ                  GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVVRPSQTLTCTVSGFSL                  TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL                  NITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD                  SWGQGS�TVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 45</p>	<p>SLT-1A-combinación 8::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 46</p>	<p>SLT-1A-combinación 9::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 47</p>	<p>SLT-1A-combinación 10::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 48</p>	<p>SLT-1A-combinación 11::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGLVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 49</p>	<p>SLT-1A-combinación 12::scFv-1</p>	<p>MAEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFT VTAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRSLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 50</p>	<p>SLT-1A-combinación 14::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFT VTAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRSLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 51</p>	<p>SLT-1A-combinación 15::scFv-1</p>	<p>MAEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFT VTAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRSLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 52</p>	<p>SLT-1A-combinación 16::scFv-1</p>	<p>MKEFILDSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFT VTAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRSLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGLVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 53</p>	<p>SLT-1A-combinación 17::scFv-1</p>	<p>MAEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITSSSLQPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGS�TVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 54</p>	<p>SLT-1A-combinación 18::scFv-1</p>	<p>MAEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVNLVPMVATVGRFNNLRLLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRTVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN NWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNS HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD DRVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV VPSRFSGSGSGTDFTFITSSSLQPEDIATYYCQQYWSNPYTFG QGTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGFSL LTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSR LNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD DSWGQGS�TVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 55</p>	<p>SLT-1A-combinación 19::scFv-1</p>	<p>MKEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDVIRGIAPIEARFNNLRLLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFT VTAEALRFRQIQRGFRTTLAALSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITSSSLQPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGGLVRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQGS�TVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 56</p>	<p>SLT-1A-combinación 20::scFv-1</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHARNL VPMVATVASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMT QSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPK LLISGATSLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITSSSLQPEDIATYYC QQYWSNPYTFGQGTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGGLVRPS QTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRG GSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAVY YCAKSMITTFVMDSWGQGS�TVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 57</p>	<p>SLT-1A-combinación 0::scFv-2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTNLVPMVATVSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLT LNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLET GVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQYWSNPYTF GQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLVR PSQTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMW RGGSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAV YYCAKSMITTFVMDSWGQGS�VTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 58</p>	<p>SLT-1A-combinación 2::scFv-2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGDFDTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLT LNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQ  GTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLVRPS QTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRG GSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAVY YCAKSMITTFVMDSWGQGS�VTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 59</p>	<p>SLT-1A-combinación 3::scFv-2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGSGDNLFAVNLVPMVATVGRFNNLRLIVERNNLYVTG FVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLT LNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLET GVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQYWSNPYTF GQGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLVR PSQTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMW RGGSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAV YYCAKSMITTFVMDSWGQGS�VTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 60</p>	<p>SLT-1A-combinación 4::scFv-2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DNLVPMVATVVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVG DRVITITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETG VPSRFSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQYWSNPYTFG QGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLVRP SQTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWR GGSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAV YYCAKSMITTFVMDSWGQGS�VTVSSA</p>



<p>SEQ ID NO: 61</p>	<p>SLT-1A-combinación 10::scFv-2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFTV VTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLV RPS QTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRG GSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVY YCAKSMITTFVMDSWGQGS LVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 62</p>	<p>SLT-1A-combinación 13::scFv-2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFTV VTAEALRFRQIQRGFRGILGDVFTRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLV RPSQT LSLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGS TDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYC AKSMITTFVMDSWGQGS LVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 63</p>	<p>SLT-1A-combinación 22::scFv-2</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVIRGIAPEEGRFNRLRIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFTV VTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSSGASYVMTAEDVDLTLN NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNS HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV VPSRFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFG QGTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLV RPS SQTLSLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWR GGSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAV YYCAKSMITTFVMDSWGQGS LVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 64</p>	<p>scFv-3::SLT-1A- combinación 5</p>	<p>MQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFSTSYNVHWV KQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSS TVYMQQLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSYVWFFDVWGA GTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASPGEKV TMTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVP ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTFGA GTKLELKEFPKPKSTPPGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSL NIRSAIGTPLQTISSGGTSLMIDSGIGDNLFAVDILGFDFTL GRFNRLRIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP GTTAVTLSDSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSGTSLTQSVARAMLRFTVVTAEALRFRQIQRGFRITL DDLSSGASYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVAR</p>

SEQ ID NO: 65	scFv-3::SLT-1A- combinación 6	MQVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFTSYNVHWV KQTPGGLEWIGAIYPNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSS TVYMQLSLSEDSAVYYCARSNYYGSSYVWFFDVWGA GTTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASPEKV TMTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP ARFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTFGA GTKLELKEFPKSTPPGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSL N VIRSAIGTPLQTISGGTSLLMIDSGIGDNLFAVDILGFDFTL GRFNRLRIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFP GTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDL MSHSATSLTQSVARAMLRFVTVTAELRFRQIQRGFRTTL DDLSGASYVMTAEDVDLTLNWGRLLSVLPDYHGQDSVRV GRISFGSINAILGSVALILNCHHHRVAR
SEQ ID NO: 66	SLT-1A-combinación 7::scFv-4	MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHA AVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASFLYSG VPSRFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG QGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 67	SLT-1A-combinación 14::scFv-4	MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVT VTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHA AVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASFLYSG VPSRFGSRSRGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFG QGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVE SGGGLVQPGSLRLS CAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLE WVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 68	SLT-1A-combinación 7::scFv-5	MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAELRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHA AVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQGISSWLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG QGTKLEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKF QGRVTITRDTASTAYMELSSLRSED TAVYYCARERIQLW FDYWGQGLVTVSS

<p>SEQ ID NO: 69</p>	<p>SLT-1A-combinación 8::scFv-5</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG QGTKLEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARERIQLW FDYWGGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 70</p>	<p>SLT-1A-combinación 9::scFv-5</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG QGTKLEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARERIQLW FDYWGGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 71</p>	<p>SLT-1A-combinación 11::scFv-5</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFG QGTKLEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTFTSYDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKF QGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDТАVYYCARERIQLW FDYWGGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 72</p>	<p>SLT-1A-combinación 7::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYG GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARRHWPGGFDYWGGQGLVTVSSGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIK</p>

<p>SEQ ID NO: 73</p>	<p>SLT-1A-combinación 8::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYG GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVVSSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 74</p>	<p>SLT-1A-combinación 9::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYG GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVVSSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 75</p>	<p>SLT-1A-combinación 21::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYG GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVVSSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 76</p>	<p>SLT-1A-combinación 23::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDLDSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYG GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVVSSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIK</p>

<p>SEQ ID NO: 77</p>	<p>SLT-1A-combinación 24::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGDFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFTV VTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFPPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYG GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 78</p>	<p>SLT-1A-combinación 25::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGDFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFTV VTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFPPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYG GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 79</p>	<p>SLT-1A-combinación 26::scFv-6</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGIGDNLFAVDILGDFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFTV VTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVALTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFPPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYG GSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCARRHWPGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSS LSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPKAPKLLIYS ASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 80</p>	<p>SLT-1A-combinación 0::scFv-8</p>	<p>MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLMI DSGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNRLRIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTNL VPMVATVSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FVTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLT LNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILN CHHASAVAAEFPPKSTPPGSSGAPDIQMTQTSSLSASL GDRVTISCRASQDISNYLAWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHS GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWT FGCGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVKPG GSLKLSAASGFASIIDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGG GTTYYPDTVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDTAMY YCARHSGYGTHWGVLFAYWGQGLVTVSA</p>

SEQ ID NO: 81	SLT-1A-combinación 7::scFv-8	MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQ RATISCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASS VDSGVPARFSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRV PYTFGGGTKLEIKGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSC KASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFDGTTY NEMFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQA WGYPWGQGTTLVTVSA
SEQ ID NO: 82	SLT-1A-combinación 7::alfaCD38-scFv-1	MKEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLLMI DSGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVLRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGOGSLVTVSS
SEQ ID NO: 83	cadena pesada ABR1	YTFTSYVMH
SEQ ID NO: 84	cadena pesada ABR2	WIGYINPYNDGTTY
SEQ ID NO: 85	cadena pesada ABR3	RGTYYYGSRVFDY
SEQ ID NO: 86	cadena ligera ABR1	KSLNLSNGNTYLY
SEQ ID NO: 87	cadena ligera ABR2	LLIYRMSNLAS
SEQ ID NO: 88	cadena ligera ABR3	MQHLEYPF
SEQ ID NO: 89	cadena pesada ABR1	YAFSSYWMN
SEQ ID NO: 90	cadena pesada ABR2	WIGQIWPGDGDTNY
SEQ ID NO: 91	cadena pesada ABR3	RRETTTVGRYYYAMDY
SEQ ID NO: 92	cadena ligera ABR1	QSVDDYDGD SYLN
SEQ ID NO: 93	cadena ligera ABR2	LLIYDASNLVS
SEQ ID NO: 94	cadena ligera ABR3	QQSTEDPW
SEQ ID NO: 95	cadena pesada ABR2	WIGQIWPGDGDTNYNG
SEQ ID NO: 96	cadena pesada ABR1	GSISTSGMGVG
SEQ ID NO: 97	cadena pesada ABR2	WIGHIWWDDDKRY

ES 2 847 373 T3

SEQ ID NO: 98	cadena pesada ABR3	RMELWSYYFDY
SEQ ID NO: 99	cadena ligera ABR1	SSVSYMH
SEQ ID NO: 100	cadena ligera ABR2	LLIYDTSKLAS
SEQ ID NO: 101	cadena ligera ABR3	FQGSVYPF
SEQ ID NO: 102	cadena pesada CDR1	GYTFTSYNMH
SEQ ID NO: 103	cadena pesada CDR2	AIYPGNGDTSYNQKFKG
SEQ ID NO: 104	cadena pesada CDR3	AQLRPNYWYFDV
SEQ ID NO: 105	cadena ligera CDR1	RASSSVSYMH
SEQ ID NO: 106	cadena ligera CDR2	ATSNLAS
SEQ ID NO: 107	cadena ligera CDR3	QQWISNPPT
SEQ ID NO: 108	cadena pesada CDR1	GYTFTSYNVH
SEQ ID NO: 109	cadena pesada CDR2	SNYYGSSYVWFFDV
SEQ ID NO: 110	cadena pesada CDR3	RASSSVSYMD
SEQ ID NO: 111	cadena ligera CDR1	STYYGGDWYFNV
SEQ ID NO: 112	cadena ligera CDR2	RASSSVSYIH
SEQ ID NO: 113	cadena ligera CDR3	QQWTSNPPT
SEQ ID NO: 114	cadena pesada CDR1	GFTFNDYAMH
SEQ ID NO: 115	cadena pesada CDR2	TISWNSSGSIGYADSVKG
SEQ ID NO: 116	cadena pesada CDR3	DIQYGNYYYGMDV
SEQ ID NO: 117	cadena ligera CDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID NO: 118	cadena ligera CDR2	DASNRAT
SEQ ID NO: 119	cadena ligera CDR3	QQRSNWPIT
SEQ ID NO: 120	cadena pesada CDR1	GYTFTSYNMH
SEQ ID NO: 121	cadena pesada CDR3	VVYYSNSYWYFDV
SEQ ID NO: 122	cadena ligera CDR2	APSNLAS
SEQ ID NO: 123	cadena ligera CDR3	QQWSFNPPT
SEQ ID NO: 124	cadena pesada CDR1	GYAFSYSWIN
SEQ ID NO: 125	cadena pesada CDR2	RIFPGDGD TDYNGKFKG
SEQ ID NO: 126	cadena pesada CDR3	NVFDGYWLVY
SEQ ID NO: 127	cadena ligera CDR1	RSSKSLHNSGITYL Y

ES 2 847 373 T3

SEQ ID NO: 128	cadena ligera CDR2	QMSNLVS
SEQ ID NO: 129	cadena ligera CDR3	AQNLELPYT
SEQ ID NO: 130	cadena pesada ABR1	YRFTNYWIH
SEQ ID NO: 131	cadena pesada ABR2	WIGGINPGNNYATYRR
SEQ ID NO: 132	cadena pesada ABR3	TREGYGNYGAWFAY
SEQ ID NO: 133	cadena ligera ABR1	QSLANSYGNTFLS
SEQ ID NO: 134	cadena ligera ABR2	LLIYGISNRFS
SEQ ID NO: 135	cadena ligera ABR3	LQGTHQPY
SEQ ID NO: 136	cadena pesada ABR1	FAFSIYDMS
SEQ ID NO: 137	cadena pesada ABR2	WVAYISSGGGTTY
SEQ ID NO: 138	cadena pesada ABR3	RHSGYGTHWGVLFAY
SEQ ID NO: 139	cadena ligera ABR1	QDISNYLA
SEQ ID NO: 140	cadena ligera ABR2	LLIYYTSILHS
SEQ ID NO: 141	cadena ligera ABR3	QQGNTLPW
SEQ ID NO: 142	cadena pesada ABR1	YTFTSYWLH
SEQ ID NO: 143	cadena pesada ABR2	WIGYINPRNDYTEY
SEQ ID NO: 144	cadena pesada ABR3	RRDITTFY
SEQ ID NO: 145	cadena ligera ABR1	QSVLYSANHKNYLA
SEQ ID NO: 146	cadena ligera ABR2	LLIYWASTRES
SEQ ID NO: 147	cadena ligera ABR3	HQYLSSW
SEQ ID NO: 148	cadena pesada ABR1	YEFRSWWMN
SEQ ID NO: 149	cadena pesada ABR2	WVGRIYPGDGDTNYSKGF
SEQ ID NO: 150	cadena pesada ABR3	RDGSSWDWYFDV
SEQ ID NO: 151	cadena ligera ABR1	QSIVHSVGNTFLE
SEQ ID NO: 152	cadena ligera ABR2	LLIYKVSNRFS
SEQ ID NO: 153	cadena ligera ABR3	FQGSQFPY
SEQ ID NO: 154	cadena pesada CDR1	GYRFTNYWIH
SEQ ID NO: 155	cadena pesada CDR2	GINPGNNY A TYRRKFQG
SEQ ID NO: 156	cadena pesada CDR3	EGYGNYGAWFAY
SEQ ID NO: 157	cadena ligera CDR1	RSSQSLANSYGNTFLS
SEQ ID NO: 158	cadena ligera CDR2	GISNRFS



ES 2 847 373 T3

SEQ ID NO: 159	cadena ligera CDR3	LQGTHQPYT
SEQ ID NO: 160	cadena pesada CDR1	GFAFSIYDMS
SEQ ID NO: 161	cadena pesada CDR2	YISSGGGTTYYPDTVKG
SEQ ID NO: 162	cadena pesada CDR3	HSGYGTHWGVLFAY
SEQ ID NO: 163	cadena ligera CDR1	RASQDISNYLA
SEQ ID NO: 164	cadena ligera CDR2	YTSILHS
SEQ ID NO: 165	cadena ligera CDR3	QQGNTLPWT
SEQ ID NO: 166	cadena pesada CDR1	GYTFTDYIT
SEQ ID NO: 167	cadena pesada CDR2	WIYPGSGNTKYNEKF
SEQ ID NO: 168	cadena pesada CDR3	YGNWYFAY
SEQ ID NO: 169	cadena ligera CDR1	KASQSVDFDGD SYMN
SEQ ID NO: 170	cadena ligera CDR2	AASNLES
SEQ ID NO: 171	cadena ligera CDR3	QQSNEDPWT
SEQ ID NO: 172	cadena pesada CDR1	YTFTTYWMH
SEQ ID NO: 173	cadena pesada CDR2	WIGYINPSTGYTDY
SEQ ID NO: 174	cadena pesada CDR3	TRRGPSYGNHGAWFPY
SEQ ID NO: 175	cadena ligera CDR1	ENVDTYVS
SEQ ID NO: 176	cadena ligera CDR2	LLIYGASNRYT
SEQ ID NO: 177	cadena ligera CDR3	GQSYRYPP
SEQ ID NO: 178	cadena pesada CDR1	GYTFTGYMH
SEQ ID NO: 179	cadena pesada CDR2	WIDPNSGATTYAQKF
SEQ ID NO: 180	cadena pesada CDR3	KTTQTTWGFPP
SEQ ID NO: 181	cadena ligera CDR1	RASQGVYQWLA
SEQ ID NO: 182	cadena ligera CDR2	KASHLYN
SEQ ID NO: 183	cadena ligera CDR3	QQLNSYPLT
SEQ ID NO: 184	cadena pesada CDR1	GYTFTDYWMH
SEQ ID NO: 185	cadena pesada CDR2	WIGYINPNTAYTDY
SEQ ID NO: 186	cadena ligera CDR1	KASENVDSFVS
SEQ ID NO: 187	cadena ligera CDR2	GASNRYT

ES 2 847 373 T3

SEQ ID NO: 188	cadena ligera CDR3	GQNYRYPLT
SEQ ID NO: 189	cadena pesada ABR1	FSLISYGVH
SEQ ID NO: 190	cadena pesada ABR2	WLGVIWRGGSTDY
SEQ ID NO: 191	cadena pesada ABR3	KTLITTGYAMDY
SEQ ID NO: 192	cadena ligera ABR1	EDIYNRLA
SEQ ID NO: 193	cadena ligera ABR2	LLISGATSLETG
SEQ ID NO: 194	cadena ligera ABR3	QQYWSTP
SEQ ID NO: 195	cadena pesada ABR1	FTFNSFAMS
SEQ ID NO: 196	cadena pesada ABR2	WVSAISGSGGGTTY
SEQ ID NO: 197	cadena pesada ABR3	KDKILWFGEPVFDY
SEQ ID NO: 198	cadena ligera ABR1	QSVSSYLA
SEQ ID NO: 199	cadena ligera ABR2	LLIYDASNRAT
SEQ ID NO: 200	cadena ligera ABR3	QQRSNWPP
SEQ ID NO: 201	cadena pesada ABR1	FSLTSYGVH
SEQ ID NO: 202	cadena pesada ABR2	WIGVMWRGGSTDY
SEQ ID NO: 203	cadena pesada ABR3	KSMITTGFVMDS
SEQ ID NO: 204	cadena ligera ABR1	EDIYNRLT
SEQ ID NO: 205	cadena ligera ABR2	LLISGATSLET
SEQ ID NO: 206	cadena ligera ABR3	QQYWSNPY
SEQ ID NO: 207	cadena pesada ABR1	FDFSRSWMN
SEQ ID NO: 208	cadena pesada ABR2	WIGEINPDSSTINY
SEQ ID NO: 209	cadena pesada ABR3	RYGNWFPY
SEQ ID NO: 210	cadena ligera ABR1	QNVDTNVA
SEQ ID NO: 211	cadena ligera ABR2	ALIYSASYRYS
SEQ ID NO: 212	cadena ligera ABR3	QQYDSYPL
SEQ ID NO: 213	cadena pesada ABR1	GTFSSYAFS
SEQ ID NO: 214	cadena pesada ABR2	WMGRVIPFLGIANS
SEQ ID NO: 215	cadena pesada ABR3	RDDIAALGPFDY
SEQ ID NO: 216	cadena ligera ABR1	QGISSWLA
SEQ ID NO: 217	cadena ligera ABR2	SLIYAASSLQS

ES 2 847 373 T3

SEQ ID NO: 218	cadena ligera ABR3	QQYNSYPR
SEQ ID NO: 219	cadena pesada ABR1	YTFTDYWMQ
SEQ ID NO: 220	cadena pesada ABR2	WIGTIYPGDGDTGY
SEQ ID NO: 221	cadena pesada ABR3	RGDYYGSNSLDY
SEQ ID NO: 222	cadena ligera ABR1	QDVSTVVA
SEQ ID NO: 223	cadena ligera ABR2	RLIYSASYRYI
SEQ ID NO: 224	cadena ligera ABR3	QQHYSPPY
SEQ ID NO: 225	cadena pesada CDR1	GFSLTSYGVH
SEQ ID NO: 226	cadena pesada CDR2	VMWRGGSTDYNAAFMS
SEQ ID NO: 227	cadena pesada CDR3	SMITTGFVMDS
SEQ ID NO: 228	cadena ligera CDR1	KASEDIYNRL T
SEQ ID NO: 229	cadena ligera CDR2	GATSLET
SEQ ID NO: 230	cadena ligera CDR3	QQYWSNPYT
SEQ ID NO: 231	cadena pesada CDR1	GFSLISYGVH
SEQ ID NO: 232	cadena pesada CDR2	VIWRGGSTDYNAAFMS
SEQ ID NO: 233	cadena pesada CDR3	TLITTGYAMDY
SEQ ID NO: 234	cadena ligera CDR1	KASEDIYNRLA
SEQ ID NO: 235	cadena ligera CDR2	GATSLET
SEQ ID NO: 236	cadena ligera CDR3	QQYWSTPT
SEQ ID NO: 237	cadena pesada CDR1	GFDFSRSWMN
SEQ ID NO: 238	cadena pesada CDR2	EINPDSSTINYTTSLKD
SEQ ID NO: 239	cadena pesada CDR3	YGNWFPY
SEQ ID NO: 240	cadena ligera CDR1	KASQNVDTNVA
SEQ ID NO: 241	cadena ligera CDR2	SASYRYS
SEQ ID NO: 242	cadena ligera CDR3	QQYDSYPLT
SEQ ID NO: 243	cadena pesada ABR1	FDPSRYWMS
SEQ ID NO: 244	cadena pesada ABR2	WIGEINPTSSTINF
SEQ ID NO: 245	cadena pesada ABR3	RGNYRYGDAMDY
SEQ ID NO: 246	cadena ligera ABR1	KSVSTSGYSYLH
SEQ ID NO: 247	cadena ligera ABR2	LLIYLASNLES
SEQ ID NO:	cadena ligera ABR3	QHSRELPF

ES 2 847 373 T3

248		
SEQ ID NO: 249	cadena pesada ABR1	STFTTYWIH
SEQ ID NO: 250	cadena pesada ABR2	WIGYINPNTGYTEY
SEQ ID NO: 251	cadena pesada ABR3	VRFITWGG
SEQ ID NO: 252	cadena ligera ABR1	SSVSSSHLH
SEQ ID NO: 253	cadena ligera ABR2	LWIYSTSNLAS
SEQ ID NO: 254	cadena ligera ABR3	HQYHRSPL
SEQ ID NO: 255	cadena pesada ABR1	FSLTTYGIGVG
SEQ ID NO: 256	cadena pesada ABR2	WLTHIWWNDNKYY
SEQ ID NO: 257	cadena pesada ABR3	YGYTY
SEQ ID NO: 258	cadena ligera ABR1	QSLLYSNGNTYLH
SEQ ID NO: 259	cadena ligera ABR2	LLIYKLSNRFS
SEQ ID NO: 260	cadena ligera ABR3	SQSTHVPW
SEQ ID NO: 261	cadena pesada ABR1	FNIKDTYIH
SEQ ID NO: 262	cadena pesada ABR2	WVARIYPTNGYTRY
SEQ ID NO: 263	cadena pesada ABR3	RWGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 264	cadena ligera ABR1	QDVNTAVA
SEQ ID NO: 265	cadena ligera ABR2	LLIYSASFLYS
SEQ ID NO: 266	cadena ligera ABR3	QQHYTTTP
SEQ ID NO: 267	cadena pesada ABR3	RWGGDGFYAMDV
SEQ ID NO: 268	cadena pesada ABR1	YSFTSYWIA
SEQ ID NO: 269	cadena pesada ABR2	YMGLIYPGSDTKY
SEQ ID NO: 270	cadena pesada ABR3	RHDVGYCSSSNCWKWPEYFQH
SEQ ID NO: 271	cadena ligera ABR1	SSNIGNNYVS
SEQ ID NO: 272	cadena ligera ABR2	LLIYGHTNRPA
SEQ ID NO: 273	cadena ligera ABR3	AAWDDSLSGW
SEQ ID NO: 274	cadena pesada ABR1	YPFTNYGMN
SEQ ID NO: 275	cadena pesada ABR2	WMGWINTSTGESTF
SEQ ID NO: 276	cadena pesada ABR3	RWEVYHGYVPY
SEQ ID NO: 277	cadena ligera ABR1	QDVYNAVA
SEQ ID NO: 278	cadena ligera ABR2	LLIYSASSRYT

ES 2 847 373 T3

SEQ ID NO: 279	cadena ligera ABR3	QQHFRTPF
SEQ ID NO: 280	cadena pesada ABR1	ITFSINTMG
SEQ ID NO: 281	cadena pesada ABR2	LVALISSIGDTYYA
SEQ ID NO: 282	cadena pesada ABR3	KRFRTAAQGTDY
SEQ ID NO: 283	cadena pesada CDR1	GFNIKDTYIH
SEQ ID NO: 284	cadena pesada CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG
SEQ ID NO: 285	cadena pesada CDR3	WGGDGFYAMDY
SEQ ID NO: 286	cadena ligera CDR1	RASQDVNTAVA
SEQ ID NO: 287	cadena ligera CDR2	SASFLYS
SEQ ID NO: 288	cadena ligera CDR3	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 289	cadena pesada CDR1	GFNIKDTYIH
SEQ ID NO: 290	cadena pesada CDR2	RIYPTNGYTRYADSVKG
SEQ ID NO: 291	cadena pesada CDR3	WGGDGFYAMDV
SEQ ID NO: 292	cadena ligera CDR1	RASQDVNTAVA
SEQ ID NO: 293	cadena ligera CDR2	SASFLYS
SEQ ID NO: 294	cadena ligera CDR3	QQHYTTPPT
SEQ ID NO: 295	cadena pesada CDR1	GYSFTSYWIA
SEQ ID NO: 296	cadena pesada CDR2	LIYPGDSDTKYSPSFQG
SEQ ID NO: 297	cadena pesada CDR3	HDVGYCSSSNC AKWPEYFQH
SEQ ID NO: 298	cadena ligera CDR1	SGSSSNIGNNYVS
SEQ ID NO: 299	cadena ligera CDR2	GHTNRPA
SEQ ID NO: 300	cadena ligera CDR3	AAWDDSLSGWV
SEQ ID NO: 301	cadena pesada CDR1	GITFSINTMG
SEQ ID NO: 302	cadena pesada CDR2	LISSIGDTYYADSVKG
SEQ ID NO: 303	cadena pesada CDR3	FRTAAQGTDY
SEQ ID NO: 304	cadena pesada ABR1	FTFSDSWIH
SEQ ID NO: 305	cadena pesada ABR2	WVAWISPYGGSTYY
SEQ ID NO: 306	cadena pesada ABR3	RRHWPGGFDY
SEQ ID NO: 307	cadena ligera ABR1	QDVSTAVA
SEQ ID NO: 308	cadena ligera ABR2	LLIYSASFLYS

ES 2 847 373 T3

SEQ ID NO: 309	cadena ligera ABR3	QQYLYHPA
SEQ ID NO: 310	cadena pesada ABR1	YTFTSYVMH
SEQ ID NO: 311	cadena pesada ABR2	WIGYVNPFDGTKY
SEQ ID NO: 312	cadena pesada ABR3	RQAWGYP
SEQ ID NO: 313	cadena ligera ABR1	ESVEYYGTSLVQ
SEQ ID NO: 314	cadena ligera ABR2	LLIYAASSVDS
SEQ ID NO: 315	cadena ligera ABR3	QQSRRVPY
SEQ ID NO: 316	cadena pesada ABR1	YTFTSYDVH
SEQ ID NO: 317	cadena pesada ABR2	WMGWLHADTGITKF
SEQ ID NO: 318	cadena pesada ABR3	RERIQLWFDY
SEQ ID NO: 319	cadena ligera ABR1	QGISSWLA
SEQ ID NO: 320	cadena ligera ABR2	SLIYAASSLQS
SEQ ID NO: 321	cadena ligera ABR3	QQYNSYPY
SEQ ID NO: 322	cadena pesada ABR1	DTFSTYAIS
SEQ ID NO: 323	cadena pesada ABR2	WMGGIIPFGKAHY
SEQ ID NO: 324	cadena pesada ABR3	RKFHFVSGSPFGMDV
SEQ ID NO: 325	cadena ligera ABR1	QSVSSYLA
SEQ ID NO: 326	cadena ligera ABR2	LLIYDASNRAT
SEQ ID NO: 327	cadena ligera ABR3	QQRSNWP
SEQ ID NO: 328	cadena pesada ABR1	FTFSSYIMM
SEQ ID NO: 329	cadena pesada ABR2	WVSSIYPSGGITFY
SEQ ID NO: 330	cadena pesada ABR3	RIKLGTVTTVDY
SEQ ID NO: 331	cadena ligera ABR1	SSDVGGYNYVS
SEQ ID NO: 332	cadena ligera ABR2	LMIYDVSNRPS
SEQ ID NO: 333	cadena ligera ABR3	SSYTSSSTR
SEQ ID NO: 334	cadena pesada CDR1	GFNIKDYFLH
SEQ ID NO: 335	cadena pesada CDR2	WINPDNGNTVYDPKFQG
SEQ ID NO: 336	cadena pesada CDR3	RDYTYEKAALDY
SEQ ID NO: 337	cadena ligera CDR1	RASGNIYNYLA
SEQ ID NO: 338	cadena ligera CDR2	DAKTLAD

SEQ ID NO: 339	cadena ligera CDR3	QHFWSLPFT
SEQ ID NO: 340	SLT1A.combinación 27	KEFILRFSVAHKYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GSGDNLFAVDVVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA
SEQ ID NO: 341	SLT1A.combinación 28	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID NLVPMVATVVDVVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHASAVAA
SEQ ID NO: 342	SLT1A.combinación 29	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SNLVPMVATVDVVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHASAVAA
SEQ ID NO: 343	SLT1A.combinación 30	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGILGFVFTLDVVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA
SEQ ID NO: 344	SLT1A.combinación 31	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID GSGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA
SEQ ID NO: 345	SLT1A.combinación 32	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID GSGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA
SEQ ID NO: 346	SLT1A.combinación 33	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID GSGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA

SEQ ID NO: 347	SLT1A.combinación 34	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA
SEQ ID NO: 348	SLT1A.combinación 35	KEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDVRGIAPIEARFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRTTLAALSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAA
SEQ ID NO: 349	SLT1A.combinación 36	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVGILGFVFTLEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHASAVAA
SEQ ID NO: 350	SLT1A.combinación 37	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVNLPVMVATVGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASAVAA
SEQ ID NO: 351	SLT1A.combinación 38	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTNLVPVMVATVSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASAVAA
SEQ ID NO: 352	SLT1A.combinación 39	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRGILGDVFTLSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 353	SLT1A.combinación 40	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHILRFSVAHKASAVAA



SEQ ID NO: 354	SLT1A.combinación 41	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HARNLVPMVATVASAVAA
SEQ ID NO: 355	STL-1Abase 1	KEFILRFSVAHKYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GSGDNLFAVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASRVAR
SEQ ID NO: 356	STL-1Abase 2 y StxA- base 1	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID NLVPMVATVVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHASRVAR
SEQ ID NO: 357	STL-1Abase 3 y StxA- base 2	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SNLVPMVATVDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHASRVAR
SEQ ID NO: 358	STL-1Abase 4 y StxA- base 3	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGILGFVFTLDVIRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASRVAR
SEQ ID NO: 359	STL-1Abase 5	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASRVAR
SEQ ID NO: 360	STL-1Abase 6	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASRVAR

SEQ ID NO: 361	STL-1Abase 7	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASRVAR
SEQ ID NO: 362	STL-1Abase 8	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASRVAR
SEQ ID NO: 363	STL-1Abase 9 y StxA- base 4	KEFILDSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDVRGIAPIEARFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRTTLAALSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SRVAR
SEQ ID NO: 364	STL-1Abase 10	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVGILGFVFTLEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHASRVAR
SEQ ID NO: 365	STL-1Abase 11	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVNLVPMVATVGRFNNLRLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHASRVAR
SEQ ID NO: 366	STL-1Abase 12	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTNLVPMVATVSYTTLQRV AGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRF VTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHASRVAR
SEQ ID NO: 367	STL-1Abase 13	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRGILGDVFTLSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASRVAR

SEQ ID NO: 368	STL-1Abase 14	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHILRFSVAHKASRVAR
SEQ ID NO: 369	STL-1Abase 15	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDILGDFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HARNLVPMTATVASRVAR
SEQ ID NO: 370	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 101	KEFILRFSVAHKYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS  GIGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHH ASAVAA
SEQ ID NO: 371	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 102	AEFILRFSVAHKYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHH ASAVAA
SEQ ID NO: 372	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 103	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID NLVPMVATVVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAA
SEQ ID NO: 373	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 104	KEFILRFSVAHKYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHH ASAVAA
SEQ ID NO: 374	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 105	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SNLVPMVATVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAA

SEQ ID NO: 375	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 106	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SNLVPVATVDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGALSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAA
SEQ ID NO: 376	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 107	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGILGFVFTLDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 377	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 108	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGILGFVFTLDVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 378	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 109	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 379	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 110	KEFILDFITAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAA
SEQ ID NO: 380	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 111	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 381	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 112	MEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISIGGTSLLMIDS GIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNA TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAA

SEQ ID NO: 382	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 113	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA
SEQ ID NO: 383	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 114	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 384	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 115	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 385	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 116	AEFTLDFITAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVNA TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 386	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 117	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 387	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 118	KEFTLDFSAATYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVNA TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAA
SEQ ID NO: 388	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 119	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA

SEQ ID NO: 389	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 120	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSATSLSLQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 390	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 121	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 391	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 122	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNAFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 392	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 123	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 393	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 124	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLTAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 394	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 125	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 395	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 126	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFVVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA

SEQ ID NO: 396	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 127	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGVDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 397	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 128	MEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGVDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 398	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 129	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAA
SEQ ID NO: 399	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 130	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH HHASAVAA
SEQ ID NO: 400	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 131	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFVFTLEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAA
SEQ ID NO: 401	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 132	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFVFTLEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV NATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAG ISRTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAA
SEQ ID NO: 402	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 133	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA

SEQ ID NO: 403	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 134	AEFILDFIAAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVNA TNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAA
SEQ ID NO: 404	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 135	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 405	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 136	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 406	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 137	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 407	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 138	MEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVNA TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 408	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 139	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 409	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 140	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GALSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHH HASAVAA



SEQ ID NO: 410	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 141	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 411	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 142	AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISCGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 412	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 143	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 413	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 144	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNATAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 414	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 145	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 415	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 146	KEFTLDFIIAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISCGGTSLLMIDS GIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR INNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAA
SEQ ID NO: 416	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 147	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA

SEQ ID NO: 417	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 148	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISCGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 418	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 149	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 419	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 150	AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 420	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 151	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 421	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 152	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA
SEQ ID NO: 422	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 153	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 423	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 154	MEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAA

SEQ ID NO: 424	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 155	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 425	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 156	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 426	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 157	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 427	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 158	AEIFLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISCGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNA TNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAA
SEQ ID NO: 428	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 159	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA
SEQ ID NO: 429	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 160	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GALSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHH HASAVAA
SEQ ID NO: 430	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 161	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAA

SEQ ID NO: 431	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 162	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID  SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTNLVPMTATVSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAA
SEQ ID NO: 432	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 163	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNAFYRFADFSHVTFPGTNLVPMTATVSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEAVALTIN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAA
SEQ ID NO: 433	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 164	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRGILGDVFTLSYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAA
SEQ ID NO: 434	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 165	AEFILDFSIAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRGILGDVFTLSYVMTAEDVDLTLNWGR LSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHAS AVAA
SEQ ID NO: 435	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 166	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ILRFSVAHKASAVAA
SEQ ID NO: 436	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 167	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GALSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHH HILRFSVAHKASAVAA
SEQ ID NO: 437	Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 168	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN ATNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLALMSHSGTSLTQSAARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVALTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ARNLVPMVATVASAVAA

<p>SEQ ID NO: 438</p>	<p>Polipéptido efector de la subunidad A de la toxina Shiga – combinación 169</p>	<p>MEFTLDFIIAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISCGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVNA TNNAFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSAARAMLRFTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVALTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA RNLVPMVATVASAVAA</p>
<p>SEQ ID NO: 439</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 1</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFTVT TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVP RFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQYWSNPYTFGGQ TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLVPSQT LSLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGS TDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYC AKSMITTFVMDSWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 440</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 2</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFTVT TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTSSLPEDFATYYCQHYTTPPTFGQG TKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGOGTLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 441</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 3</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVNLVPMVATVGRFNNRLLIVERNNLYVTGF VNRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVA GISRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLR FTVTAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLTL NWGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNC HHHASAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLET GVPSRFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQYWSNPYTF GQTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLV RPSQTLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWR GGSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAV YYCAKSMITTFVMDSWGQGLVTVSSA</p>

<p>SEQ ID NO: 442</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 4</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID  NLVPMVATVVDVVRGIDPEEGRFNNLRLIVERNNLYVTGFV  NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGI  SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVT  VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLN  WGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCH  HHASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD  RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV  PSRFSGSGSGTDFTFITISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ  GTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLVRPS  QTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRG  GSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLLSSVTAADTAVY  YCAKSMITTFVMDSWGOGSLVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 443</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 5</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFTSYNVHWVK  QTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSST  VYMQLSLTSSEDAVYYCARSNYYGSSYVWFFDVWGAG  TTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASPGEKVT  MTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPA  RFSGSGSGTSLTISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTFGAG  TKLELKEFPKSTPPGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSLNI  RSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLFAVDILGFDFTLGR  FNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGT  TAVTLSADSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS  HSGTSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDD  LSGASYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGR  ISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVAR</p>
<p>SEQ ID NO: 444</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 6</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID  SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN  RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS  RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV  TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW  GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH  HASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPQVQLQQPGAELVKPGAS  VKMSCKTSGYTFTSYNVHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNG  DTSFNQKFKGKATLTADKSSSTVYMQLSLTSSEDAVYYC  ARSNYYGSSYVWFFDVWGAGTTVTVSSGSTSGSGKPGSG  EGSQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMDWYQQ  KPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSLTISRVEA  EDAATYYCQQWISNPPTFGAGTKLELK</p>
<p>SEQ ID NO: 445</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 7</p>	<p>QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKTSGYTFTSYNVHWVK  QTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSST  VYMQLSLTSSEDAVYYCARSNYYGSSYVWFFDVWGAG  TTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASPGEKVT  MTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPA  RFSGSGSGTSLTISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTFGAG  TKLELKEFPKSTPPGSSGGAPKEFTLDFSTAKTYVDSLNI  RSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLFAVDILGFDFTLGR  FNNLRLIVERNNLYVTGFVNRTNNVFYRFADFSHVTFPGT  TAVTLSADSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS  HSATSLTQSVARAMLRFVTVTAEALRFRQIQRGFRTTLDD  LSGASYVMTAEDVDLTLNWGRLLSSVLPDYHGQDSVRVGR  ISFGSINAILGSVALILNCHHHASRVAR</p>

<p>SEQ ID NO: 446</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 8</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPQVQLQQPGAELVKPGAS VKMSCKTSGYTFTSYNVHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNG DTSFNQKFKGKATLTADKSSSTVYMLSSLTSEDSAVYYC ARSNYYGSSYVWFFDVWGAGTTVTVSSGSTSGSGKPGSG EGSQIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMDWYQQ KPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEA EDAATYYCQQWISNPPTFGAGTKLELK</p>
<p>SEQ ID NO: 447</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 9</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVDRV TITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF SSYAFSWVRQAPGQGLEWMGRVIPFLGIANSQAQKFGGRV TITADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARDIAALGPF YWGQGLTVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 448</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 10</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCRAVESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS GVPARFSGSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRVPYT FGGGTKLEIKGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS GYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFDGTYNEM FKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQAWG YPWGQGLTVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 449</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 11</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCRAVESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS GVPARFSGSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRVPYT FGGGTKLEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQL QQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPG QGLEWIGYVNPFDGTYNEMFKGKATLTSKSSSTAYM ELSSLTSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGLTVTVSA</p>

<p>SEQ ID NO: 450</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 12</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRRTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPEIVLTQSPATLSLSPGERAT LSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGT KVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVQSGA EVKKPGSSVKVCKTSGDTFSTY AISWVRQAPGQGLEWM GGIPIFGKAHYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYFCARKFHVSVSGSPFGMDVWGQGTTVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 451</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 13</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRRTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPQVQLVQSGAEVKKPGSSV KVCKTSGDTFSTY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGKA HYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR KHFVSGSPFGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGG SGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTD FTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPTFGQGTKVEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 452</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 14</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRRTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCKASQSVDFDGD SYMNWYQQKPGQPPKVLIIAASNLE SGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPW TFGGGTKLEIKGGGGSQIQLQSGPEVVKPGASVKISCKAS GYTFTDYYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKF KGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSEDTAVYFCANYGNYW FAYWGQGTQVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 453</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 15</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRRTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASV GDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFISSLQPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLV RPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD S WGQGLVTVSS</p>



<p>SEQ ID NO: 454</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 16</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 455</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 17</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIVMTQAAPSIVTPGESVS ISCRSSKLLNSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSNLAS GVPDRFSGSGGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPF TFGAGTKLELKGSTSGSGKPGSGEGSEVQLQQSGPELIKPG ASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPY NDGTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVY YCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 456</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 18</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISNYLAWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGCG TKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVKPGGSLKL SCAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTTY PDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHS GYGTHWGVLFAYWGQGLTVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 457</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 19</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGPGLVVPSQT LSLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGS TDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYC AKSMITTFVMDSWGQGLTVTVSS</p>

SEQ ID NO: 458	Molécula de reconocimiento celular 20	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIELTQSPSSFSVSLGDRVT ITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSR FSGSGSGKDYTLTSLQTEDVATYYCQQYWSTPTFGGGT KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSKVQLQESGPSLVQPSQRLSITC TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTDYNA AFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYFCAKTLITT GYAMDYWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO: 459	Molécula de reconocimiento celular 21	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVRSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFGVMS WGQGS�TVTVSS
SEQ ID NO: 460	Molécula de reconocimiento celular 22	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYT FTSYDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKFGQ RVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERIQWFDF YWQGTLLTVTVSS
SEQ ID NO: 461	Molécula de reconocimiento celular 23	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFVFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTLLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGS TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARRHWPGGFDYWGQGTLLTVVSSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLY HPATFGQGTKVEIK

<p>SEQ ID NO: 462</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 24</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD WGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 463</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 25</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPYTFGQG TKLEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYT FTSYDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKFGQ RVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERIQLWFD YWQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 464</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 26</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAVISPYGGS TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARRHWPGGFDYWGQGLVTVSSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLY HPATFGOGTKVEIK</p>
<p>SEQ ID NO: 465</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 27</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVSRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD WGQGLVTVSS</p>

SEQ ID NO: 466	Molécula de reconocimiento celular 28	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITSSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGGVQLQESGGLVVRPSQT LSLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGS TDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRSLSSVTAADTAVYYC AKSMITTFGVMDSWGQGLVTVSSA
SEQ ID NO: 467	Molécula de reconocimiento celular 29	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTSSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKRTGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYT RYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDVWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 468	Molécula de reconocimiento celular 30	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIELTQSPSSFSVSLGDRV ITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSR FSGSGSGKDYTSLITSLQTEDVATYYCQQYWSPTFGGGT KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSKVQLQESGGLVQPSQRSLITC TVSGFSLISYGVHWVRQSPGKGLEWLVWVWRGGSTDYNA AFMSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYFCAKTLITT GYAMDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 469	Molécula de reconocimiento celular 31	KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTSSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS

<p>SEQ ID NO: 470</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 32</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIVMTQAAPSIVTPGESVS ISCRSSKSLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLAS GVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPF TFGAGTKLELKGSTSGSGKPGSGEGSEVQLQQSGPELIKPG ASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPY NDGTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVY YCARGTYYYGSRVFDYWGGQTTLTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 471</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 33</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQTSSLSASLGDRV TISCRASQDISNYLAWYQQKPDGTVKLLIYYTSILHSGVPS RFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGCG TKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVKPGGSLKL SCAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTTY PDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHS GYGTHWGVLFAYWGGOTLVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 472</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 34</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQPPKVLIIYAASNLE SGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPW TFGGGTKLEIKGGGGSQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKAS GYTFTDYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKF KGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSEDTAVYFCANYGNYW FAYWGGQTQVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 473</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 35</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPQITLKESGPGILQPSQTL TCSFSGFSLTTYGIGVGWIRQPPGKLEWLTHIWWNDNKY YNTALRSRLTISKDSSNNQVLLKIANVDTADTATYYCLYG YTYWGGQTLVTVSAGGGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQAS ISCRSSQSLLYSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKLSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWT FGGGTKLEIK</p>

<p>SEQ ID NO: 474</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 36</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFPPKSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDS GVPARFSGSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRVPYT FGGGTKLEIKGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS GYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFDGTYNEM FKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQAWG YPWGQGTLVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 475</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 37</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFPPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITGTFVMS WGOGSLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 476</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 38</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFPPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYNSYPYTFGQG TKLEIKGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYT FTSYDVHWVRQAPGQRLEWMGWLHADTGITKFSQKFGQ RVTITRDTASASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARERIQLWFD YWGQGTLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 477</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 39</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVGILGFVFTLGRFNNRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFPPKSTPPGSSGGAPEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGS TYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC ARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSSGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVITICRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYLY HPATFGQGTKEIK</p>

<p>SEQ ID NO: 478</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 40</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD WGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 479</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 41</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTSSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRSCAASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGLVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 480</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 42</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRGILGDVFRSYVMTAEDVDLTLNW RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQGT TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGGLVLRPSQTL LSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTD YNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAK SMITTFVMDSWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 481</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 43</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGGLVLRPSQ LSLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGG STDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYC AKSMITTFVMDSWGQGLVTVSS</p>

<p>SEQ ID NO: 482</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 44</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD WGQSLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 483</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 45</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLT GGLVQPGGSLRRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEW VARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 484</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 46</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD WGQSLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 485</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 47</p>	<p>KEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLRIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQGTK VEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLTSY GVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLNIT KDNSKNQVSLRRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMDSW GQGLVTVSS</p>



SEQ ID NO: 486	Molécula de reconocimiento celular 48	KEFILDGFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGDQSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASFLYSGVPSR FSGSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGTTLTVSSA
SEQ ID NO: 487	Molécula de reconocimiento celular 49	KEFILDGFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGDQSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQRATI SCKASQSVDFDGD SYMNWYQQKPGQPPKVLIIYAASNLES GIPARFSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPWT FGGGTKLEIKGGGGSQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKASG YTFDYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFK GKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSED TAVYFCANYGNYWF AYWGQGTQVTVSA
SEQ ID NO: 488	Molécula de reconocimiento celular 50	KEFILDGFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGDQSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIVMTQAAPSIPVTPGESVSI SCRSSKLLNSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLIYRMSNLAS GVPDRFSGSGSFTAFLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPF TFGAGTKLELKGSTSGSGKPGSGEGSEVQLQQSGPELIKPG ASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPY NDGTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVY YCARGTYYYGSRVFDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO: 489	Molécula de reconocimiento celular 51	QVQLQPGAEELVKPGASVKMSCKTSGYTFSTSYNVHWVK QTPGQGLEWIGAIYPNGDTSFNQKFKGKATLTADKSSST VYMQQLSSLTSEDSAVYYCARSNYYGSSYVWFFDVWGAG TTVTVSSGSTSGSGKPGSGEGSQIVLSQSPTILSASPGKVT MTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPA RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWISNPPTFGAG TKLELKEFPKPSTPPGSSGGAPKEFILDGFSTAKTYVDSLNI RSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDSGIGDNLFAVDILGFDFTLGR FNNLRLIVERNNLYVTGFVNRNTNNVFYRFADFSHVTFPGT TAVTLSADSSYTTLQRVAGISRTGMQINRHSLTTSYLDLMS HSATSLTQSVARAMLRFTVTAEALRFRQIQRGFRITLDD LSGASYVMTAEDVDLTLNWGRLSSVLPDYHGDQSVRVGR ISFGSINAILGSVALILNSHHHASAVAA

<p>SEQ ID NO: 490</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 52</p>	<p>KEFILD FSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDL SGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISNYLAWYQQKPDGTVKLLIYYTSLHSGVPSRF SGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQQGNTLPWTFGCGT KLEIKGSTSGSGKPGSGEGSEVQLVESGGGLVKPGSLKLS CAASGFAFSIYDMSWVRQTPEKCLEWVAYISSGGGTTYYP DTVKGRFTISRDNANTLYLQMSLKS EDTAMYYCARHS GYGTHWGVLFAYWGOGLVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 491</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 53</p>	<p>KEFILD FSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDL SGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRTI TCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFITSSLPEDIATYYCQQYWSNPYTFGQGTK VEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGGVQLQESGPGLVRSQTL LTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTD YNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAK SMITTFVMDSWGQGLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 492</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 54</p>	<p>KEFILD FSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDL SGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIELTQSPSSFSVSLGDRVTIT CKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSRFS GSGSGKDYTLTITSLQTEDVATYYCQQYWSTPTFGGGTKL EIKGSTSGSGKPGSGEGSKVQLQESGPSLVQPSQRLSITCTV SGFSLISYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWRGGSTDYNAAF MSRLSITKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYFCAKTLITTYG AMDYWGQGTITVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 493</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 55</p>	<p>KEFILD FSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTL SADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDL SGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPQITLKEGPGILQPSQTLST CSFSGFSLTTYGIGVGWIRQPPGKGLEWLTHIWWNDNKYY NTALRSRLTISKDSSNNQVLLKIANVDTADTATYYCLYGY TYWGQGLVTVSAGGGGSDVVMTQTPLSLPSVSLGDQASIS CRSSQSLLYSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKLSNRFSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHVPWTF GGGTKLEIK</p>

SEQ ID NO: 494	Molécula de reconocimiento celular 56	KEFILDVFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS
SEQ ID NO: 495	Molécula de reconocimiento celular 57	KEFILDVFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQRATI SCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSG VPARFSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRVPYTF GGGKLEIKGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS GYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFDNGTKYNEM FKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQAWG YPWGQGLVTVSA
SEQ ID NO: 496	Molécula de reconocimiento celular 58	AEFILDVFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFITISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQGTK VEIKGGGGSQVQLQESGPGLVRSQTLSTCTVSGFSLTSY GVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLNIT KDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFGVMDSW GQGS�VTVSS
SEQ ID NO: 497	Molécula de reconocimiento celular 59	AEFILDVFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVNLVPMVATVGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVRSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFGVMD WGQGS�VTVSS

<p>SEQ ID NO: 498</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 60</p>	<p>KEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDVRGIAPIEARFNNRLLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRTTLAALSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQGTK VEIKGGGGSQVQLQESGGLVRPSQTLSTCTVSGFSLTSY GVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLNIT KDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMDSW GQGSLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 499</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 61</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSDGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ARNLVPMVATVASAVAAEFKPSTPPGSSGGAPDIQMTQS PSSLSASVGDRVITITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLI SGATSLETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQ YWSNPYTFGQGTKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVRPSQTL SLTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGST DYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCA KSMITTFVMDSWGQSLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 500</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 62</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNRLLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSDSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSGTSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSDGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNCHH HASAVAAEFKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDR VTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVP SRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVRPSQTLSTCTVSGFSL TSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRL NITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMD SWGQSLVTVSS</p>
<p>SEQ ID NO: 501</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 63</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGSGDNLFAVDVRGIAPEEGRFNNRLLIVERNNLYVTGFV NRTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGI SRTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVT VTAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSDGASYVMTAEDVDLTLN WGRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSH HHASAVAAEFKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQ GTKVEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGGLVRPS QTLSTCTVSGFSLTSYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRG GSTDYNAAFMSRLNITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVY YCAKSMITTFVMDSWGQSLVTVSSA</p>

<p>SEQ ID NO: 502</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 64</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDVQVTQSPSSLSASVGDRV TITCRSSQSLANSYGNTFLSWYLHKPGKAPQLLIYGISNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLOGTHQPYT FGQGTKVEIKGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYRFTNYWIHWVRQAPGQGLEWIGGINPGNNYATYRRK FQGRVTMTADTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTREGYG NYGAWFAYWGQGLVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 503</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 65</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIVLTQSPASLAVSLGQRA TISCKASQSVDFDGDSYMNWYQQKPGQPPKVLIIAASNLE SGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPW TFGGGTKLEIKGGGGSQIQLQQSGPEVVKPGASVKISCKAS GYTFTDYIITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKF KGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSEDTA VYFCANYGNYW FAYWGQGTQVTVSA</p>
<p>SEQ ID NO: 504</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 66</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGPGLVVRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRRLSSVTAADTA VYYCAKSMITTFGVMS WGQGS�TVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 505</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 67</p>	<p>KEFILDSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDVIRGIAPIEARFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTVT AEALRFRQIQRGFRTTLAALSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFKPKSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYWSNPYTFGQGTK VEIKGGGGSQVQLQESGPGLVVRPSQTLSTCTVSGFSLTSY GVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLNIT KDNSKNQVSLRRLSSVTAADTA VYYCAKSMITTFGVMSW GQGS�TVSSA</p>

<p>SEQ ID NO: 506</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 68</p>	<p>KEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQGTK VEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLTSY GVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLNIT KDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFGVMDSW GQGSLVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 507</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 69</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFGVMDSW WGQSLVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 508</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 70</p>	<p>AEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRTTLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNWG RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQGTK VEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLTSY GVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLNIT KDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFGVMDSW GQGSLVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 509</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 71</p>	<p>KEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNNLRLIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRTTLDDLGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPS RFSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQG TKVEIKGGGGSQVQLQESGGLVLRPSQTLSTCTVSGFSLT SYGVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLN ITKDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFGVMDSW WGQSLVTVSSA</p>

<p>SEQ ID NO: 510</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 72</p>	<p>KEFILDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMIDS GIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVNR TNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGISR TGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV AEALRFRQIQRGFRITLDDLSGASYVMTAEDVDLTLNW RLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHHA SAVAAEFPKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRVTI TCKASEDIYNRLTWYQQKPGKAPKLLISGATSLETGVPSRF SGSGSGTDFTFTISSLQPEDATYYCQQYWSNPYTFGQGTK VEIKGGGGSQVQLQESGPGLVGPSQTLSTCTVSGFSLTSY GVHWVRQPPGRGLEWIGVMWRGGSTDYNAAFMSRLNIT KDNSKNQVSLRLSSVTAADTAVYYCAKSMITTFVMDSW GOGSLVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 511</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 73</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPSTPPGSSGGAPDIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYASFLYSGVP SRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQG TKVEIKGGGGSEVQLVESGGGLVQPGSLRLSQAASGFNI KDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRF TISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM DYWGQGLTVTVSSA</p>
<p>SEQ ID NO: 512</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 74</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPSTPPGSSGGAPAIQMSQSPASLSASVGETV TITCRASGNIYNLAWYQQKQKSPHLLVYDAKTLADGV PSRFSGSGSGTQYSLKISSLQTEDSGNYCQHFWSLPFTFG SGTKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQQSGAELVRPG ALVKLSCKTSGFNIDYFLHWVRQRPDQGLEWIGWINPDN GNTVYDPKFQGTASLTADTSSNTVYLQLSGLTSEDYAVYF CTRRDYTYEKAALDYWGQGTITVTVST</p>
<p>SEQ ID NO: 513</p>	<p>Molécula de reconocimiento celular 75</p>	<p>AEFTLDFSTAKTYVDSLNVIRSAIGTPLQTISSGGTSLLMID SGIGDNLFAVDILGFDFTLGRFNRLRIVERNNLYVTGFVN RTNNVFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSADSSYTTLQRVAGIS RTGMQINRHSLTTSYLDLMSHSATSLTQSVARAMLRFVTV TAEALRFRQIQRGFRITLDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNW GRLSSVLPDYHGQDSVRVGRISFGSINAILGSVALILNSHHH ASAVAAEFKPSTPPGSSGGAPDIQLTQSPSLPVTLGQPAS ISCRSSQSLVHRNGNTYLHWVQQRPGQSPRLLIYTVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSSHVPPT FGAGTRLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKQVQLQQSGSELK KPGASVKVCSKASGYTFTNYGVNWIKQAPGQGLQWMGW INPNTGEPTFDDDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKADDT AVYFCSRSGKNEAWFAYWGQGLTVTVSS</p>

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende:
- 5 i) un epítipo de células T CD8+ heterólogo, integrado o insertado; y  
 ii) una alteración de al menos una región del epítipo de células B y/o de células T CD4+, endógena, que no se solapa con el epítipo de células T CD8+ heterólogo, integrado o insertado, en el que el polipéptido efector de toxina Shiga es capaz de exhibir una función efectora de toxina Shiga seleccionada entre una o más de:
- 10 dirigir el enrutamiento intracelular al citosol de una célula en la que está presente el polipéptido,  
 dirigir el enrutamiento intracelular con una carga, inhibir la función ribosómica, inactivar enzimáticamente un ribosoma y citotoxicidad; y  
 en el que el polipéptido efector de toxina Shiga comprende o consiste en una secuencia que es al menos 85% idéntica a una secuencia seleccionada de:
- 15 (i) aminoácidos 75 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3;  
 (ii) aminoácidos 1 a 241 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3;  
 (iii) aminoácidos 1 a 251 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; y  
 (iv) aminoácidos 1 a 261 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
2. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 1, que comprende un epítipo de células T CD8+ heterólogo, integrado; en el que el epítipo de células T CD8+ heterólogo integrado reemplaza un número equivalente de residuos de aminoácidos en un polipéptido efector de toxina Shiga parental de manera que el polipéptido efector de toxina Shiga tiene el mismo número total de aminoácidos que el polipéptido efector de toxina Shiga parental.
- 25 3. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de administrar intracelularmente el epítipo de células T CD8+ heterólogo, integrado o insertado, desde un compartimento endosómico temprano de una célula en el cual el polipéptido efector de la toxina Shiga está presente en una molécula MHC de clase I de la célula; opcionalmente en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de exhibir una o más funciones efectoras de la toxina Shiga además de la administración intracelular del epítipo de células T CD8+ heterólogo integrado desde un compartimento endosómico temprano de una célula en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga está presente a una molécula MHC de clase I de la célula.
- 30 4. Polipéptido efector de la toxina Shiga de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la alteración comprende una mutación, en relación con una subunidad A de la toxina Shiga de tipo salvaje, en la región del epítipo de células B y/o células T CD4+, seleccionada del grupo de regiones de subunidad A de toxina Shiga situadas de forma nativa que consisten en:
- 35 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 210-218 de SEQ ID NO: 3; 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4-33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 34-78 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 77-103 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 128-168 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 160-183 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 236-258 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 274-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 40 45 5. Polipéptido efector de la toxina Shiga de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el epítipo de células T CD8+ heterólogo, integrado o insertado, altera la región del epítipo de células B y/o de epítipo de células T CD4+ endógena, seleccionada del grupo de regiones de subunidad A de toxina Shiga situadas de forma nativa, que consisten en:
- 50 1-15 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 3-14 de SEQ ID NO: 3; 26-37 de SEQ ID NO: 3; 27-37 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 39-48 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 42-48 de SEQ ID NO: 3; 53-66 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94-115 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141-153 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 140-156 de SEQ ID NO: 3; 179-190 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179-191 de SEQ ID NO: 3; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 210-218 de SEQ ID NO: 3; 240-260 de SEQ ID NO: 3; 243-257 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 254-268 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 262-278 de SEQ ID NO: 3; 281-297 de SEQ ID NO: 3; 285-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4-33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 34-78 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 77-103 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 128-168 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 160-183 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 236-258 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 274-293 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
- 55 60 6. Polipéptido efector de la toxina Shiga de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende alteraciones de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más regiones de epítipo de células B y/o células T CD4+
- 65 240



endógenas.

7. Polipéptido efector de la toxina Shiga de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que al menos una alteración comprende una sustitución de residuo de aminoácido en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje; opcionalmente en el que al menos una alteración comprende una pluralidad de sustituciones de residuos de aminoácidos en la región del epítipo con respecto a una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje.

8. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 7, en el que:

(i) se encuentra al menos una sustitución en el residuo de aminoácido de la subunidad A de la toxina Shiga A situada de forma nativa. seleccionado del grupo que consiste en:

1 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 4 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 6 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 8 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 9 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 11 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 12 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 33 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 43 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 44 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 45 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 46 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 47 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 48 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 49 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 50 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 51 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 53 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 54 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 55 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 56 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 57 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 58 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 59 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 60 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 61 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 62 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 84 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 88 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 94 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 96 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 104 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 105 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 107 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 108 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 109 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 110 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 111 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 112 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 141 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 147 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 154 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 179 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 180 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 181 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 183 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3; 184 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 185 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 186 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 187 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 188 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 189 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 197 de la SEQ ID NO: 3; 198 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 204 de SEQ ID NO: 3; 205 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 247 de SEQ ID NO: 3; 248 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 250 de SEQ ID NO: 3; 251 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; 264 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3; 265 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2; y 286 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2;

(ii) se selecciona al menos una sustitución del grupo que consiste en:

D a A, D a G, D a V, D a L, D a I, D a F, D a S, D a Q, D a M, D a R, E a A, E a G, E a V, E a L, E a I, E a F, E a S, E a Q, E a N, E a D, E a M, E a R, F a A, F a G, F a V, F a L, F a I, G a A, G a P, H a A, H a G, H a V, H a L, H a I, H a F, H a M, I a A, I a V, I a G, I a C, K a A, K a G, K a V, K a L, K a I, K a M, K a H, L a A, L a V, L a G, L a C, N a A, N a G, N a V, N a L, N a I, N a F, P a A, P a G, P a F, R a A, R a G, R a V, R a L, R a I, R a F, R a M, R a Q, R a S, R a K, R a H, S a A, S a G, S a V, S a L, S a I, S a F, S a M, T a A, T a G, T a V, T a L, T a I, T a F, T a M, T a S, V a A, V a G, Y a A, Y a G, Y a V, Y a L, Y a I, Y a F, Y a M e Y a T; y/o

(iii) se selecciona al menos una sustitución del grupo de sustituciones en posiciones nativas en una subunidad A de toxina Shiga que consiste en:

K1 a A, G, V, L, I, F, M o H; T4 a A, G, V, L, I, F, M o S; D6 a A, G, V, L, I, F, S, Q o R; S8 a A, G, V, I, L, F o M; T9 a A, G, V, I, L, F, M o S; S9 a A, G, V, L, I, F o M; K11 a A, G, V, L, I, F, M o H; T12 a A, G, V, I, L, F, M, S o K; S12 a A, G, V, I, L, F o M; S33 a A, G, V, L, I, F, M o C; S43 a A, G, V, L, I, F o M; G44 a A o L; S45 a A, G, V, L, I, F o M; T45 a A, G, V, L, I, F o M; G46 a A o P; D47 a A, G, V, L, I, F, S, M o Q; N48 a A, G, V, L, M o F; L49 a A, V, C o G; Y49 a A, G, V, L, I, F, M o T; F50 a A, G, V, L, I o T; A51 a V; D53 a A, G, V, L, I, F, S o Q; V54 a A, G, I o L; R55 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; G56 a A o P; 157 a A, G, V o M; L57 a A, V, C, G, M o F; D58 a A, G, V, L, I, F, S o Q; P59 a A, G o F; E60 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M, T o R; E61 a A, G, V, L, I, F, S, Q, N, D, M o R; G62 a A; R84 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; V88 a A o G; 188 a A, V, C o G; D94 a A, G, V, L, I, F, S o Q; S96 a A, G, V, I, L, F o M; T104 a A, G, V, L, I, F, M; o N; A105 a L; T107 a A, G, V, L, I, F, M o P; S107 a A, G, V, L, I, F, M o P; L108 a A, V, C o G; S109 a A, G, V, I, L, F o M; T109 a A, G, V, I, L, F, M o S; G110 a A; S112 a A, G, V, L, I, F o M; D111 a A, G, V, L, I, F, S, Q o T; S112 a A, G, V, L, I, F o M; D141 a A, G, V, L, I, F, S o Q; G147 a A; V154 a A o G. R179 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; T180 a A, G, V, L, I, F, M o S; T181 a A, G, V, L, I, F, M o S; D183 a A, G, V, L, I, F, S o Q; D184 a A, G, V, L, I, F, S o Q; L185 a A, G, V o C; S186 a A, G, V, I, L, F o M; G187 a A; R188 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; S189 a A, G, V, I, L, F o M; D198 a A, G, V, L, I, F, S o Q; R204 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; R205 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; S247 a A, G, V, I, L, F o M; Y247 a A, G, V, L, I, F o M; R248 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; R250 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; R251 a A, G, V, L, I, F, M, Q, S, K o H; D264 a A, G, V, L, I, F, S o Q; G264 a A; y T286 a A, G, V, L, I, F, M o S.

9. Polipéptido efector de la toxina Shiga de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende o consiste en el polipéptido mostrado en cualquiera de:

SEQ ID NO: 5, que comprende además: (i) un epítipo de células T CD8+ heterólogo, integrado o insertado que no

se solapa con la al menos una región de epítipo de células B y/o células T CD4+ endógena alterada; o SEQ ID NO: 4, que comprende además: (i) un epítipo de células T CD8+ heterólogo, integrado o insertado; y (ii) una alteración de al menos un epítipo de células B y/o de células T CD4+, endógeno, que no se solapa con el epítipo de células T CD8+ heterólogo integrado o insertado.

- 5
10. Polipéptido efector de la toxina Shiga de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga es capaz de exhibir una actividad de inhibición de ribosomas con un valor de concentración inhibidora semimáxima (IC<sub>50</sub>) de 10 000 picomolar o menos.
- 10 11. Polipéptido efector de la toxina Shiga de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende una o más mutaciones en relación con una Subunidad A natural de un miembro de la familia de toxinas Shiga que cambia una actividad enzimática del polipéptido efector de la toxina Shiga, la mutación seleccionada de al menos una delección, inserción o sustitución de residuo de aminoácido; opcionalmente en el que la una o más mutaciones reducen o eliminan la citotoxicidad del polipéptido efector de toxina Shiga.
- 15 12. Polipéptido efector de la toxina Shiga de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el polipéptido efector de la toxina Shiga comprende:  
una región del fragmento A1 de toxina Shiga que tiene un extremo carboxi terminal y  
20 un motivo de escisión por furina alterado en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1.
13. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 12, en el que el motivo de escisión por furina alterado comprende una o más mutaciones, en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje, alterando la mutación al menos un residuo de aminoácido en una región situada de forma nativa  
25 en 248-251 de la Subunidad A de la toxina semejante a Shiga 1 (SEQ ID NO: 1) o la toxina Shiga (SEQ ID NO: 2), o en 247-250 de la Subunidad A de la toxina semejante a Shiga 2 (SEQ ID NO : 3).
14. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el motivo de escisión por furina alterado comprende una sustitución de residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina  
30 en relación con una subunidad A de toxina Shiga de tipo salvaje;  
opcionalmente en el que la sustitución del residuo de aminoácido en el motivo de escisión por furina es de un residuo de arginina por un residuo de aminoácido no cargado positivamente seleccionado del grupo que consiste en:  
alanina, glicina, prolina, serina, treonina, aspartato, asparagina, glutamato, glutamina, cisteína, isoleucina, leucina,  
35 metionina, valina, fenilalanina, triptófano y tirosina.
15. Polipéptido efector de la toxina Shiga de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende o consiste en el polipéptido mostrado en cualquiera de las SEQ ID NO: 6-27, 29-32, 340-354 y 370-438.
- 40 16. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 15, que comprende o consiste en el polipéptido que se muestra en la SEQ ID NO: 12.
17. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 15, que comprende o consiste en el polipéptido mostrado en cualquiera de las SEQ ID NO: 6-10, 13-27, 29-32, 340-354 y 370-438.
- 45 18. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 17, que comprende o consiste en el polipéptido que se muestra en la SEQ ID NO: 13.
19. Polipéptido efector de la toxina Shiga de la reivindicación 17, que comprende o consiste en el polipéptido que se muestra en la SEQ ID NO: 31.
- 50 20. Molécula de reconocimiento celular que comprende  
i) una región de unión capaz de unirse específicamente a una biomolécula diana extracelular físicamente acoplada a la superficie celular de una célula, y  
55 ii) el polipéptido efector de la toxina Shiga de cualquiera de las reivindicaciones 1-19.
21. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 20, en la que la región de unión comprende una región de unión de tipo inmunoglobulina;  
opcionalmente en la que la región de unión de tipo inmunoglobulina comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:  
60 fragmento de anticuerpo de dominio único, fragmento variable de cadena sencilla, fragmento variable de anticuerpo, fragmento de la región determinante de complementariedad 3, polipéptido FR3-CDR3-FR4 limitado, fragmento Fd, fragmento de unión a antígenos, polipéptido de repetición de armadillo, dominio de tipo III de la 10<sup>a</sup> fibronectina derivada de fibronectina, dominio de tipo de III de tenascina, dominio motivo de repetición de anquirina, dominio A derivado de receptor de lipoproteína de baja densidad, lipocalina, dominio Kunitz, dominio Z derivado de proteína A,  
65 dominio derivado de cristalina gamma-B, dominio derivado de ubiquitina, polipéptido derivado de Sac7d, dominio

SH2 derivado de Fyn, miniproteína, estructura ("scaffold") de dominio tipo lectina tipo C, mimético de anticuerpos modificados y cualquier homólogo manipulado genéticamente de cualquiera de los anteriores que conservan la funcionalidad de unión.

5 22. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 20, en la que la región de unión comprende un dominio  $V_H$  autónomo, un dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de un fragmento  $V_{HH}$  o un fragmento de dominio  $V_H$  de camélido, dominio de anticuerpo de cadena pesada derivado de pescado cartilaginoso, nuevo receptor de antígeno de inmunoglobulina (IgNAR), fragmento  $V_{NAR}$ , fragmento scFv multimerizante (diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo), minicuerpo bivalente, scFv en tándem biespecífico scFv,  $V_{HH}$  en tándem biespecífico o minicuerpo biespecífico.

15 23. Molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-22, que comprende un resto molecular asociado con el extremo carboxi terminal del polipéptido efector de la toxina Shiga; opcionalmente en la que el resto molecular comprende al menos un aminoácido que une el polipéptido efector de la toxina Shiga al resto molecular, tal como en la que el resto molecular y el polipéptido efector de la toxina Shiga se fusionan formando un polipéptido continuo.

20 24. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 23, en la que el resto molecular comprende o consiste en la región de unión; o en la que el resto molecular es citotóxico.

25 25. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 24, en la que el polipéptido efector de la toxina Shiga no es citotóxico y el resto molecular es citotóxico.

26. Molécula de reconocimiento celular de cualquiera de las reivindicaciones 20-25, por la cual, tras la administración de la molécula de reconocimiento celular a una célula físicamente acoplada con una biomolécula diana extracelular de la región de unión, la molécula de reconocimiento celular es capaz de causar la muerte de la célula.

30 27. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 26, en la que dicha célula o primera población de células está físicamente acoplada con dicha biomolécula diana extracelular por medio de interacciones intermoleculares covalentes y/o no covalentes que acoplan la biomolécula diana extracelular, o una porción de la misma, al exterior de una célula; o en la que dicha biomolécula diana extracelular es una proteína de membrana integral o proteína de membrana periférica expresada por la célula o la primera población de células.

35 28. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 26 o la reivindicación 27, en la que la molécula de reconocimiento celular es capaz de exhibir un efecto citotóxico que es al menos 3 veces mayor en una primera población de células cuyos miembros están acoplados físicamente a biomoléculas diana extracelulares de la región de unión en comparación con una segunda población de células cuyos miembros no están físicamente acoplados a ninguna biomolécula diana extracelular de la región de unión.

40 29. Molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-28, en la que la región de unión es capaz de unirse a una biomolécula diana extracelular seleccionada del grupo que consiste en:  
 45 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 proteína tirosina quinasa, anhidrasa carbónica IX, proteína de unión a folato, gangliósido GD2, gangliósido GD3, gangliósido GM2, gangliósido Lewis-Y2, VEGFR, Alfa V beta3, Alfa5beta1, ErbB1/EGFR, Erb3, c-MET, IGF1R, EphA3, TRAIL-R1, TRAIL-R2, RANGO, 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  
 50 carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno de células madre de próstata, aspartil (asparaginil) beta-hidroxilasa humana, EphA2, HER3/ErbB-3, MUC1, MART-1/MelanA, gp100, antígeno asociado a tirosinasa, HPV-E7, antígeno del virus Epstein-Barr, Bcr-Ab1, antígeno alfa-fetoproteico, 17-A1, antígeno tumoral vesical, CD38, CD15, CD23, CD45, CD53, CD88, CD129, CD183, CD191, CD193, CD244, CD294, CD305, C3AR, IL-1R, galectina-9, mrp-14, NKG2D, PD-L1, Siglec-8, Siglec-10, CD49d, CD13, CD44, CD54, CD63, CD69, CD123, TLR4, FcεR1a, IgE, CD107a, CD203c, CD14, CD68, CD80, CD86, CD105, CD115, F4/80, ILT-3, galectina-3, CD11a-c, GITRL, molécula MHC de clase I, molécula MHC de clase II, CD284, CD107-Mac3, CD195, HLA-DR, CD16/32, CD282, CD11c, y cualquier fragmento inmunogénico de cualquiera de los anteriores.

60 30. Molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-29, que comprende el péptido enlazador mostrado en las SEQ ID NO: 540-543, 544-550 o 553-559.

31. Molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-30, en la que la región de unión comprende una secuencia de polipéptidos seleccionada de cualquiera de las SEQ ID NO: 83-339.

65 32. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 31, en la que la región de unión comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende: (i) una HCDR1 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 120, o SEQ ID NO: 124; (ii) una HCDR2 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 125; y (iii) una HCDR3 que comprende o que  
5 consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 121 o SEQ ID NO: 126; y

b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende: (i) una LCDR1 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en la SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 117, o SEQ ID NO: 127; (ii) una LCDR2 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 122 o SEQ ID NO: 128; y (iii) una LCDR3 que  
10 comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, o SEQ ID NO: 129.

33. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 31, en la que la región de unión comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende: (i) una HCDR1 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 289, SEQ ID NO: 295, o SEQ ID NO: 301; (ii) una HCDR2 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 290, SEQ ID NO: 296 o SEQ ID NO: 302; y (iii) una HCDR3 que comprende o que  
15 consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 291, SEQ ID NO: 297 o SEQ ID NO: 303; y

b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende (i) una LCDR1 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 292 o SEQ ID NO: 298; (ii) una LCDR2 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 287, SEQ ID NO: 293, o SEQ ID NO: 299; y (iii) una LCDR3 que comprende o que consiste en las secuencias de  
20 aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 288, SEQ ID NO: 294 o SEQ ID NO: 300;

o

a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende: (i) una HABR1 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 268 o SEQ ID NO: 274; (ii) una HABR2 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 269, o SEQ ID NO: 275; y (iii) una HABR3 que comprende o que consiste en las secuencias de  
30 aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 263, SEQ ID NO: 267, SEQ ID NO: 270, o SEQ ID NO: 276; y

b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende: (i) una LABR1 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 264, SEQ ID NO: 271 o SEQ ID NO: 277; (ii) una LABR2 que comprende o que consiste en las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 265, SEQ ID NO: 272 o SEQ ID NO: 278; y (iii) una LABR3 que comprende o que consiste en las secuencias de  
35 aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 266, SEQ ID NO: 273 o SEQ ID NO: 279;

o

a) un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>H) que comprende: (i) una HABR1 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 280; (ii) una HABR2 que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 281; y (iii) una HABR3 que comprende o que  
40 consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 282.

34. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 31, en la que la región de unión comprende:

a) un dominio variable de cadena pesada (VH) que comprende: (i) una HCDR1 que comprende o que consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO : 225, SEQ ID NO: 231, o SEQ ID NO: 237; (ii) una HCDR2 que comprende o que consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 232 o SEQ ID NO: 238; y (iii) un HCDR3 que comprende o que consiste en una de las  
50 secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 233, o SEQ ID NO: 239; y

b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende: (i) una LCDR1 que comprende o que consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 228, SEQ ID NO: 234 o SEQ ID NO: 240; (ii) una LCDR2 que comprende o que consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 235 o SEQ ID NO: 241; y (iii) una LCDR3 que comprende o que consiste en una de las  
55 secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 236 o SEQ ID NO: 242;

o

a) un dominio de cadena variable (VH) que comprende: (i) una HABR1 que comprende o que consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 213, o SEQ ID NO: 219; (ii) una HABR2 que comprende o consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 208, SEQ ID  
60 NO: 214 o SEQ ID NO: 220; y (iii) una HABR3 que comprende o que consiste en una de las secuencias de  
65 NO: 214 o SEQ ID NO: 220; y (iii) una HABR3 que comprende o que consiste en una de las secuencias de

aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 215, o SEQ ID NO: 221; y

b) un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende (i) una LABR1 que comprende o que consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 216, o SEQ ID NO: 222; (ii) una LABR2 que comprende o consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 217, o SEQ ID NO: 223; y (iii) una LABR3 que comprende o consiste en una de las secuencias de aminoácidos como se muestran en SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 206, SEQ ID NO: 212, SEQ ID NO: 218, o SEQ ID NO: 224.

35. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 31, en la que la región de unión comprende o consiste en el polipéptido representado por cualquiera de los siguientes:

(i) aminoácidos 1-245 de cualquiera de las SEQ ID NO: 33, 64 y 65;

(ii) aminoácidos 269-513 de cualquiera de las SEQ ID NO: 40 y 80; o

(iii) los aminoácidos 269-520 o 269-521 de cualquiera de las SEQ ID NO: 36, 66 y 67.

36. Molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-35 que comprende el polipéptido efector de la toxina Shiga que comprende o consiste en la SEQ ID NO: 13.

37. Molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-35, que comprende o consiste en el polipéptido mostrado en una cualquiera de las SEQ ID NO: 43-62, 64-82, 439-500 y 502-513.

38. Molécula de reconocimiento celular de la reivindicación 37, que comprende o consiste en el polipéptido mostrado en una cualquiera de las SEQ ID NO: 44, 82 o 453.

39. Molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-38, en forma de un homomultímero o un heteromultímero.

40. Molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-39, en forma de una sal o solvato farmacéuticamente aceptables.

41. Composición farmacéutica que comprende:

el polipéptido efector de toxina la Shiga de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19 o la molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-40, y

al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable.

42. Composición de diagnóstico que comprende:

la molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-40 y un agente promotor de la detección.

43. Polinucleótido capaz de codificar el polipéptido efector de la toxina Shiga de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19 o la molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-40, o un complemento del mismo.

44. Polipéptido efector de la toxina Shiga de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, una molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-40, o una composición farmacéutica de la reivindicación 41, para usar en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un paciente que lo necesite.

45. Polipéptido efector de la toxina Shiga de cualquiera de las reivindicaciones 1-19, una molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-40, o una composición farmacéutica de la reivindicación 41, para usar en el tratamiento o prevención de cáncer, tumor, trastorno inmunitario e infección microbiana; opcionalmente en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en:

cáncer de hueso, cáncer de mama, cáncer del sistema nervioso central/periférico, cáncer gastrointestinal, cáncer de células germinales, cáncer glandular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hematológico, cáncer de riñón-tracto urinario, cáncer de hígado, cáncer de pulmón/pleura, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de piel, cáncer uterino;

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

46. Uso del polipéptido efector de la toxina Shiga de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, la molécula de reconocimiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 20-40, la composición farmacéutica de la reivindicación 41, o la composición de diagnóstico de la reivindicación 42 en el diagnóstico, pronóstico o

caracterización in vitro de una enfermedad, trastorno o afección.

Figura 1. Dibujo esquemático de polipéptidos efectores de toxina Shiga de ejemplo y moléculas de reconocimiento de la presente invención

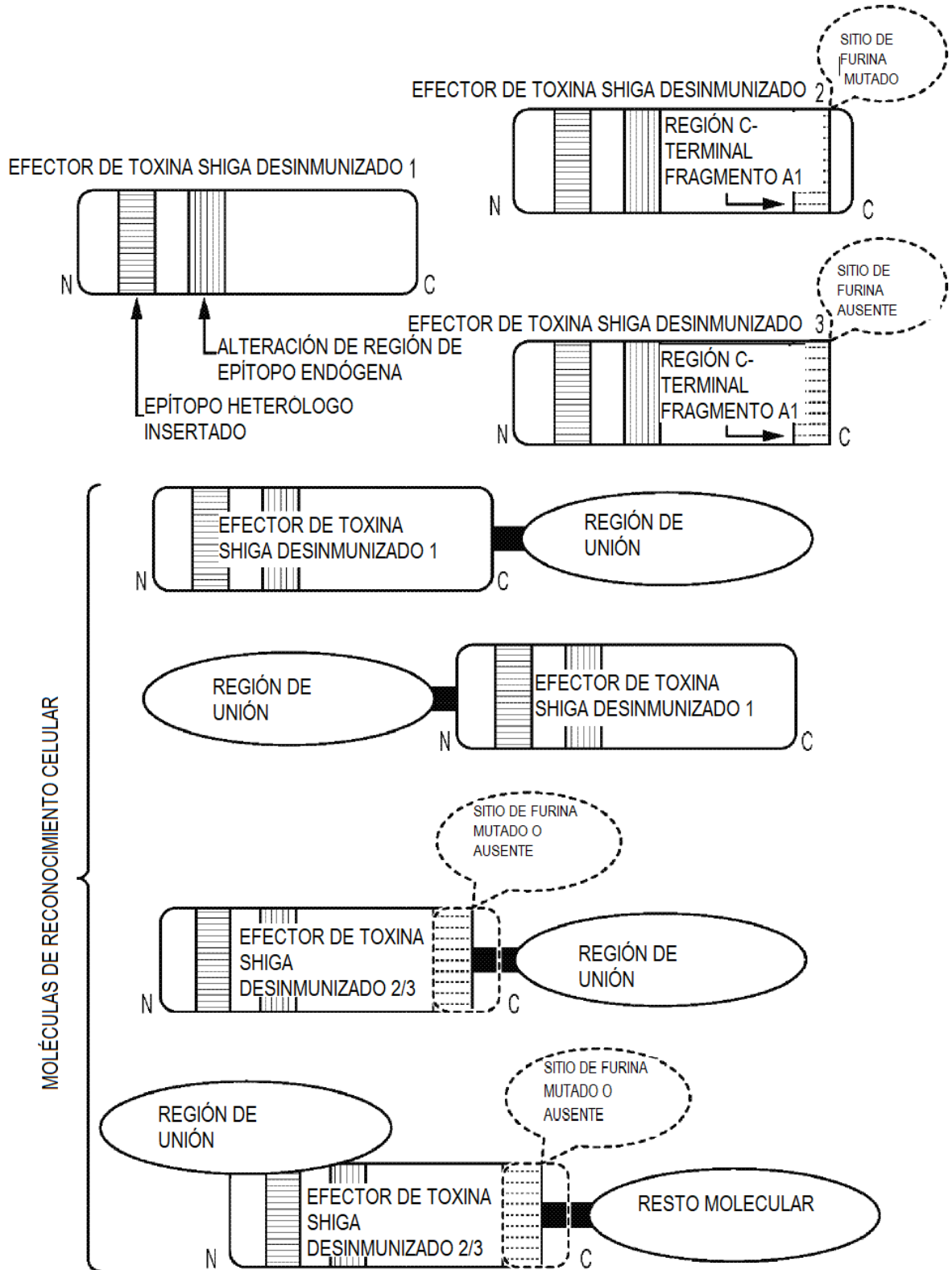


Figura 1 (continuación)

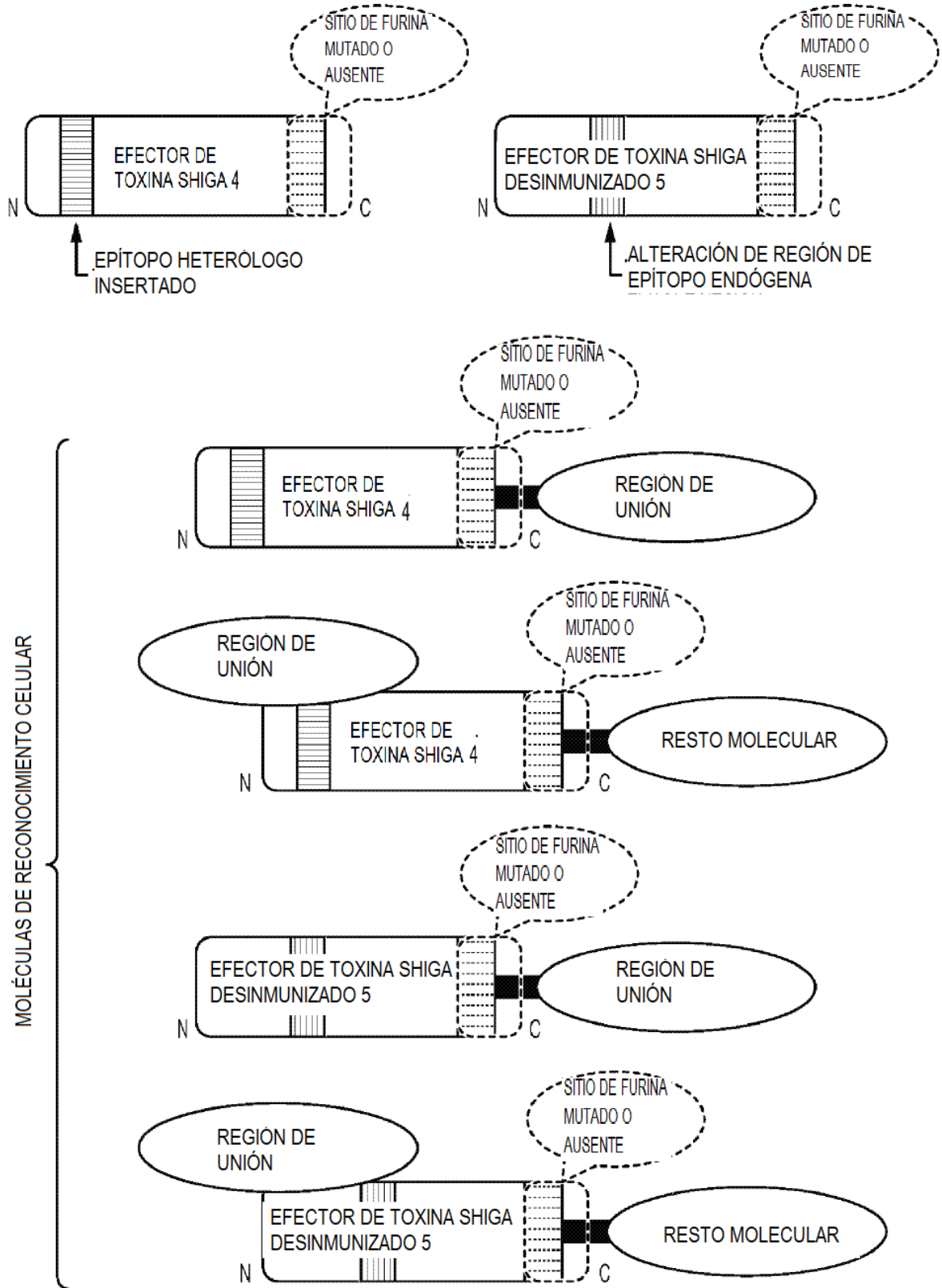




Figura 2. Actividades de inhibición de ribosoma *in vitro* de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención

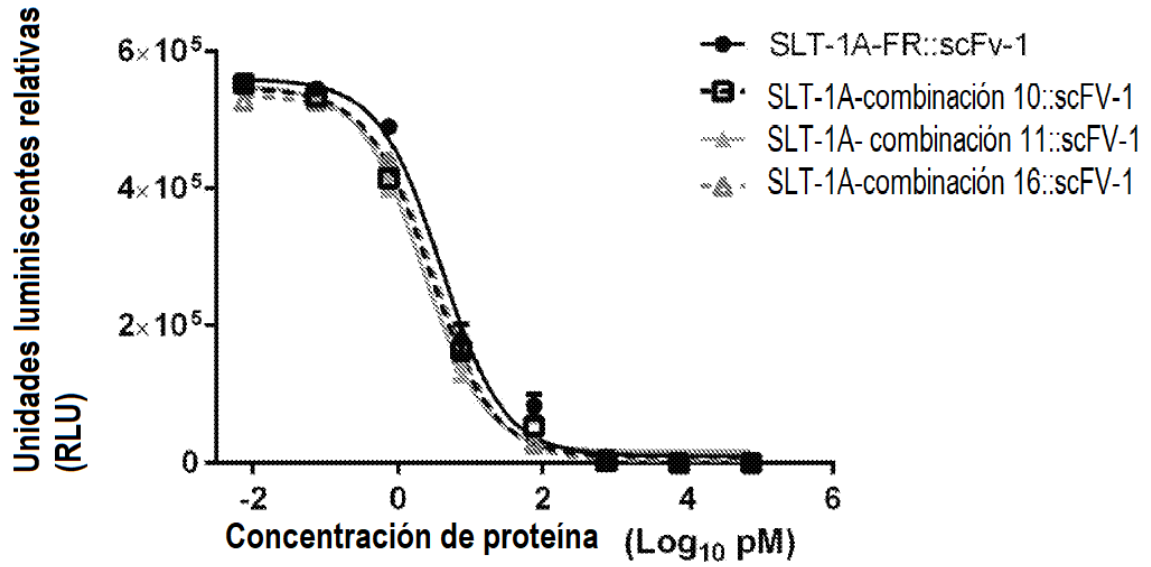


Figura 3. Actividades citotóxicas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención

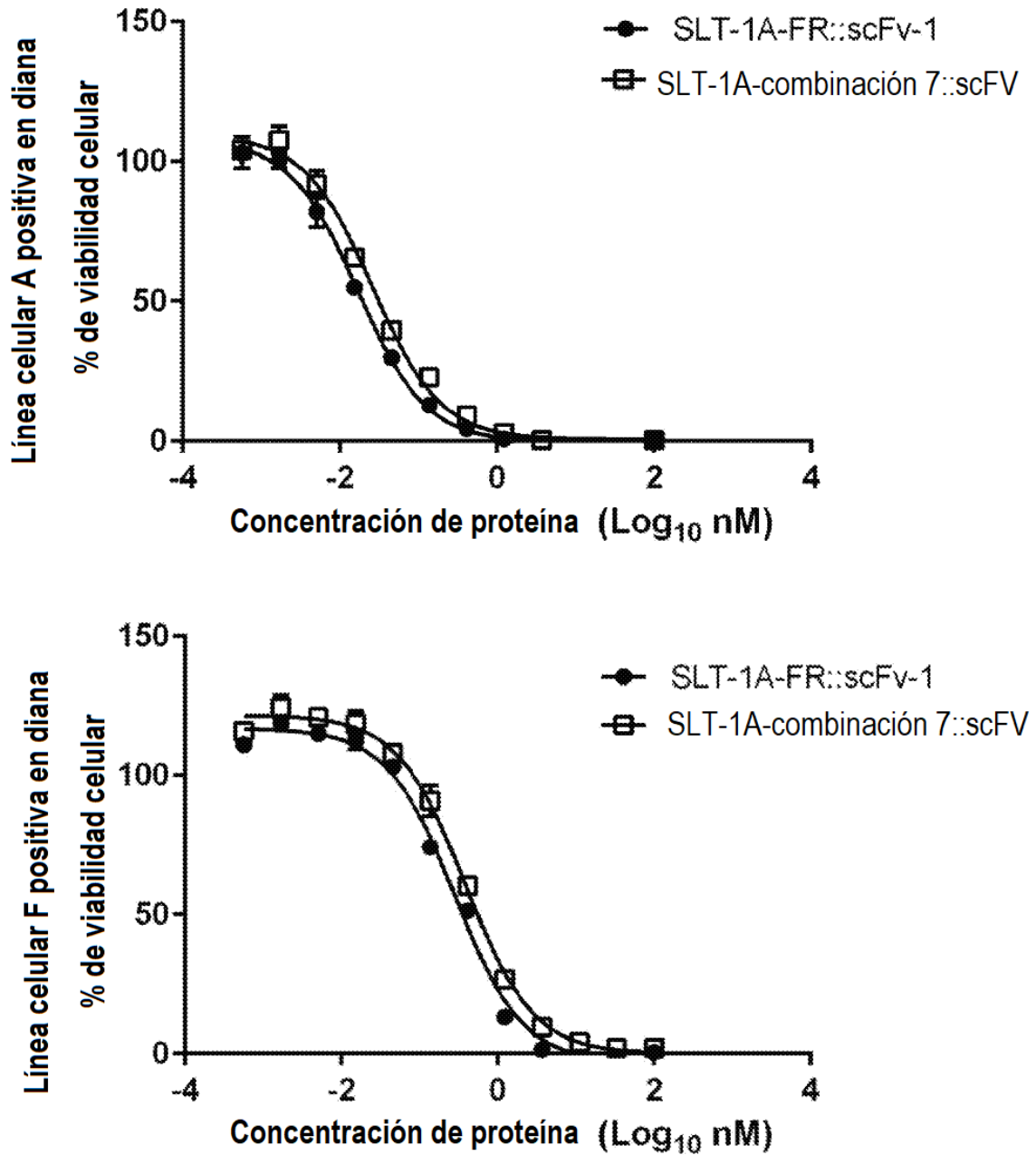


Figura 4. Actividades citotóxicas de moléculas de reconocimiento celular de la invención

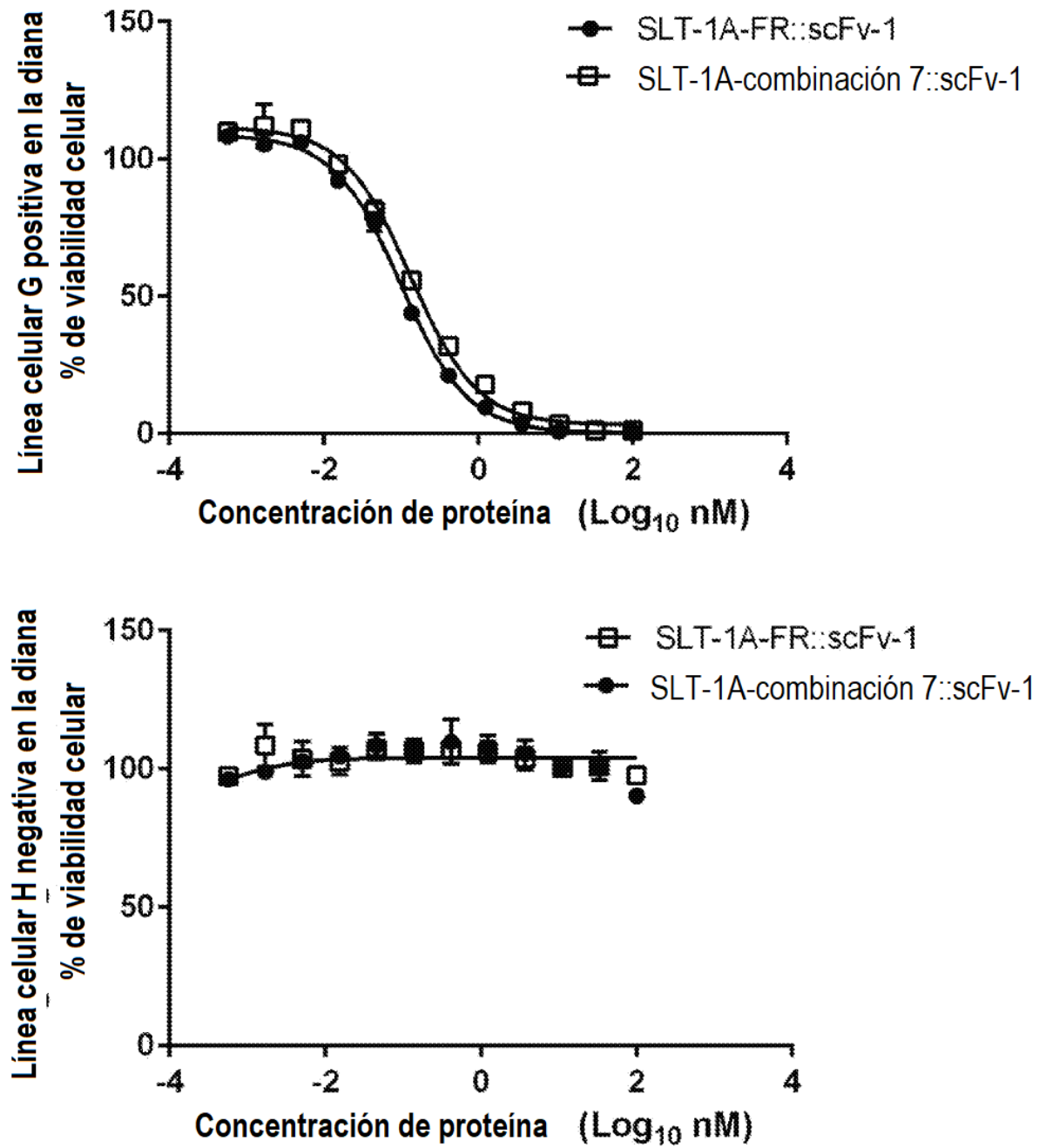


Figura 5. Actividades citotóxicas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención

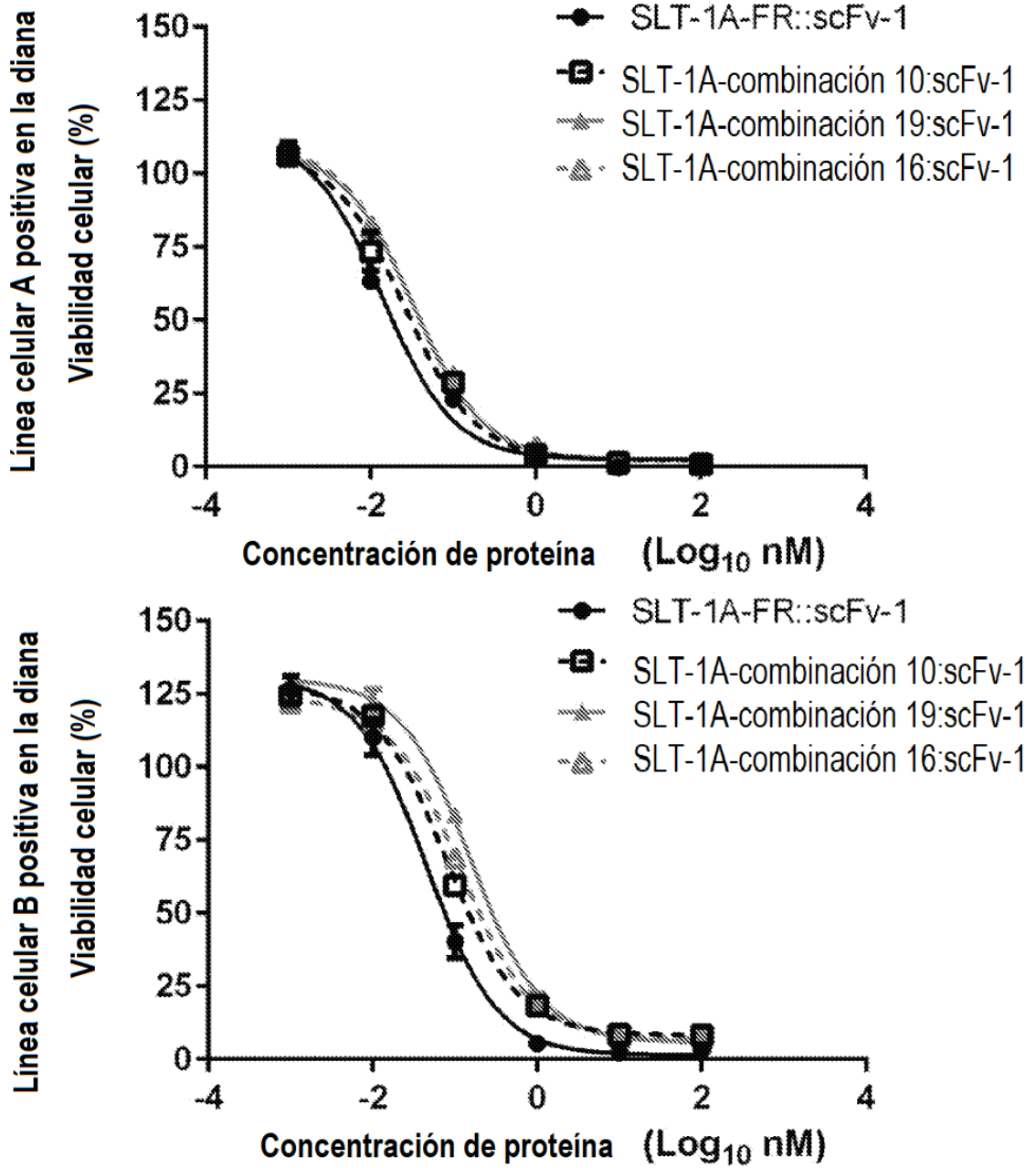


Figura 6. Actividades citotóxicas de moléculas de reconocimiento celular de la invención

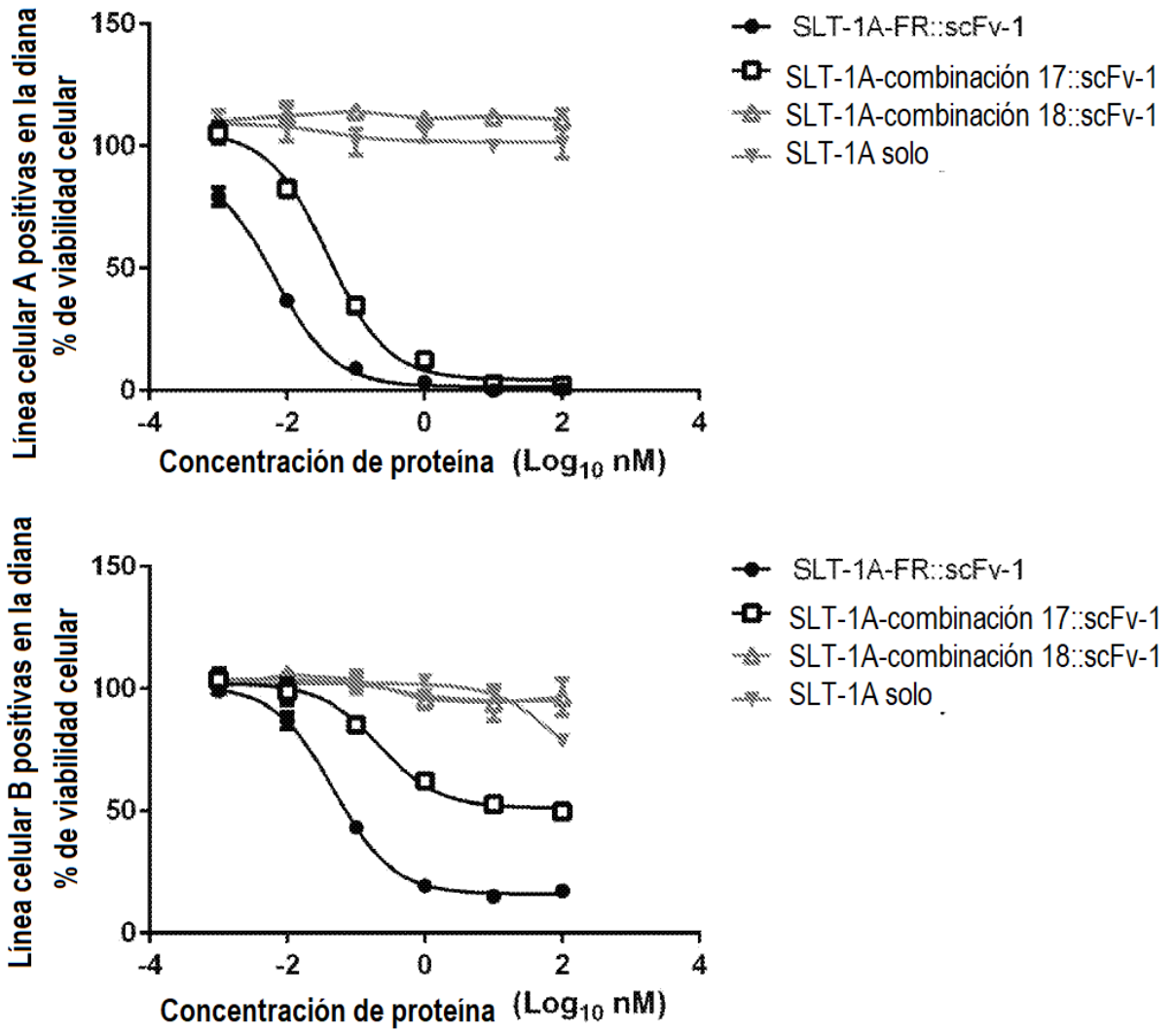


Figura 7. Actividades citotóxicas de moléculas de reconocimiento celular de la invención

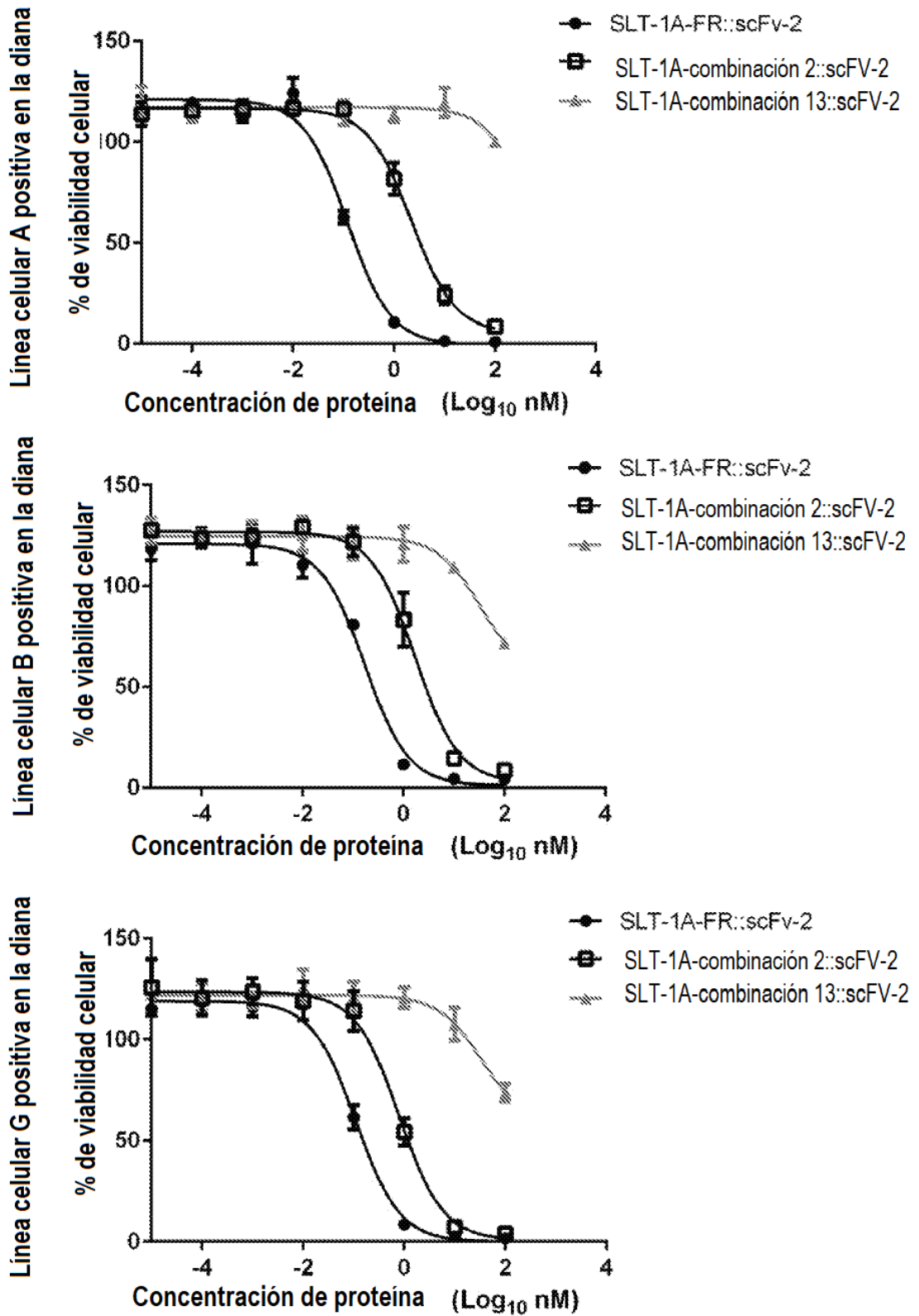


Figura 8. Actividades citotóxicas de moléculas de reconocimiento celular de la invención

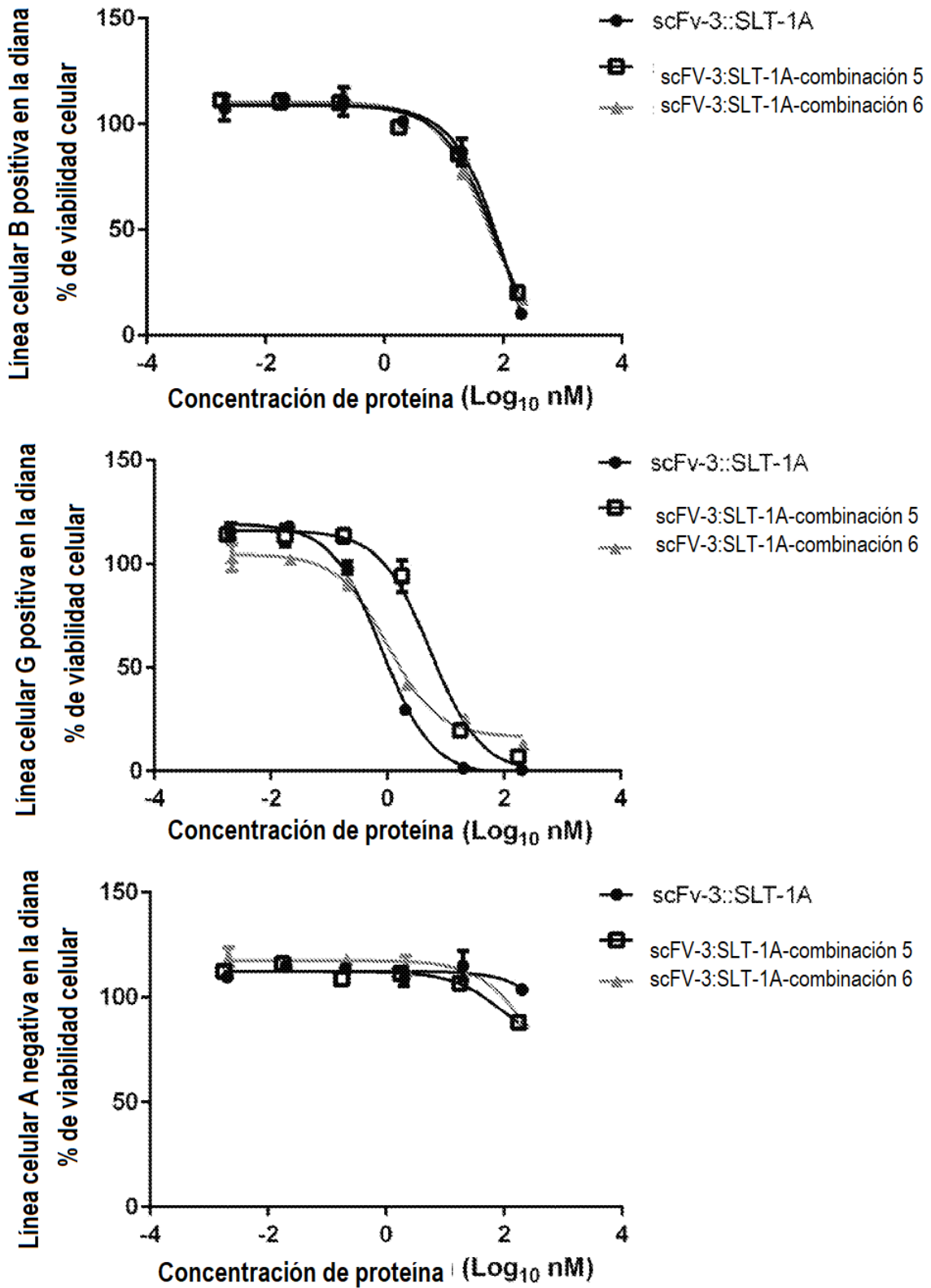


Figura 9. Actividades citotóxicas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención

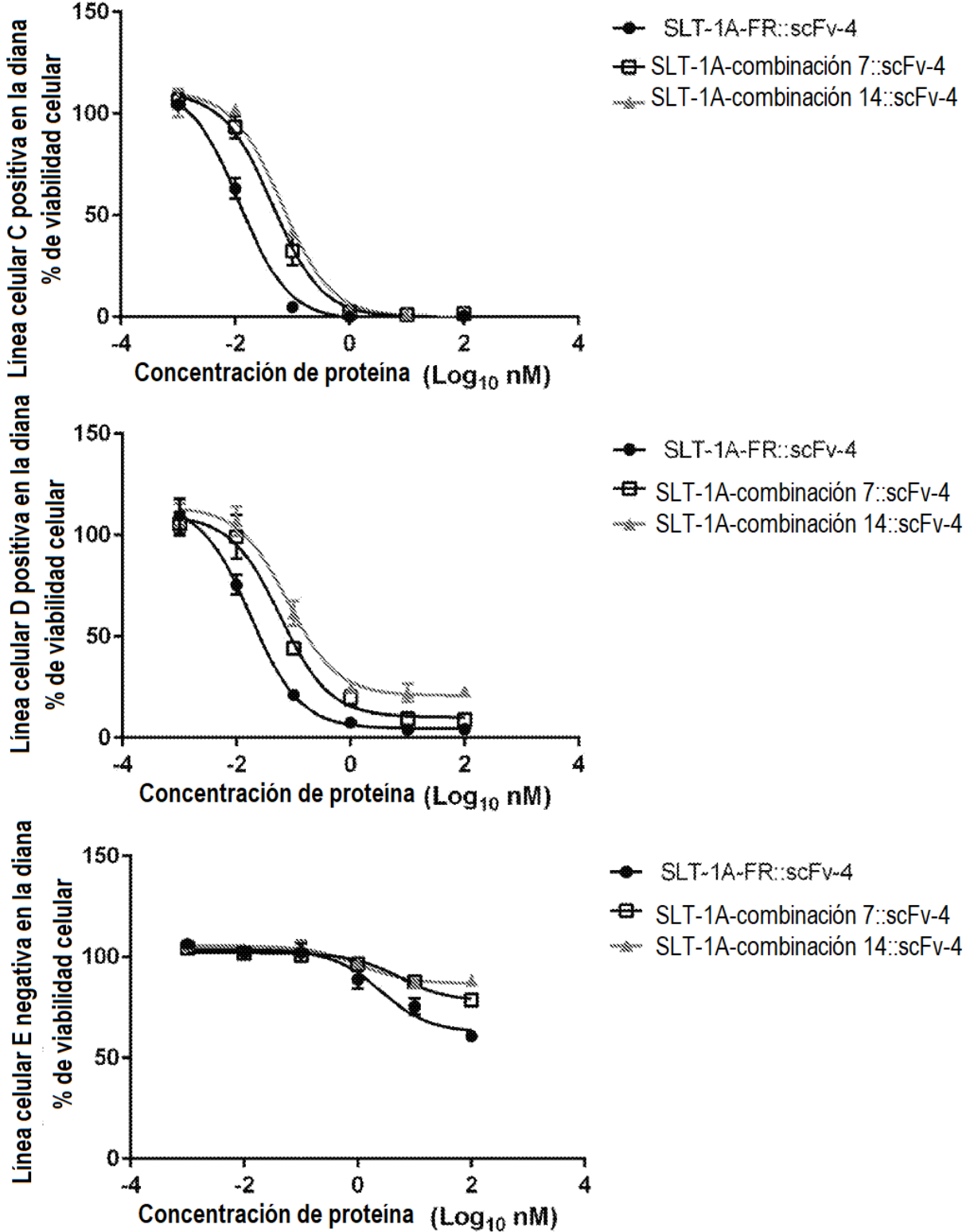




Figura 10. Actividades citotóxicas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención

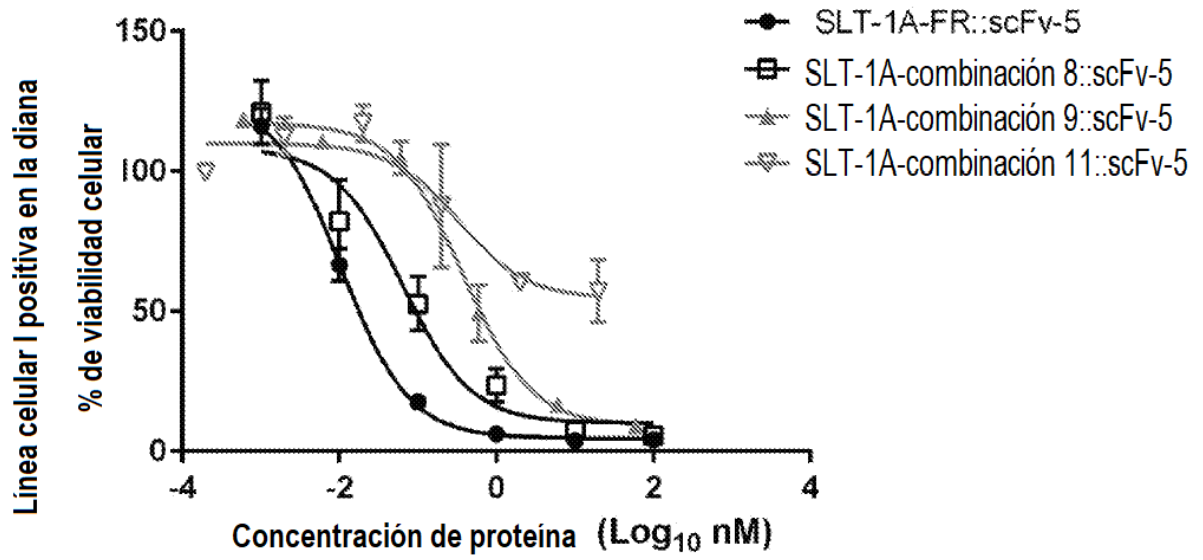


Figura 11. Actividad de caspasa inducida por moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención

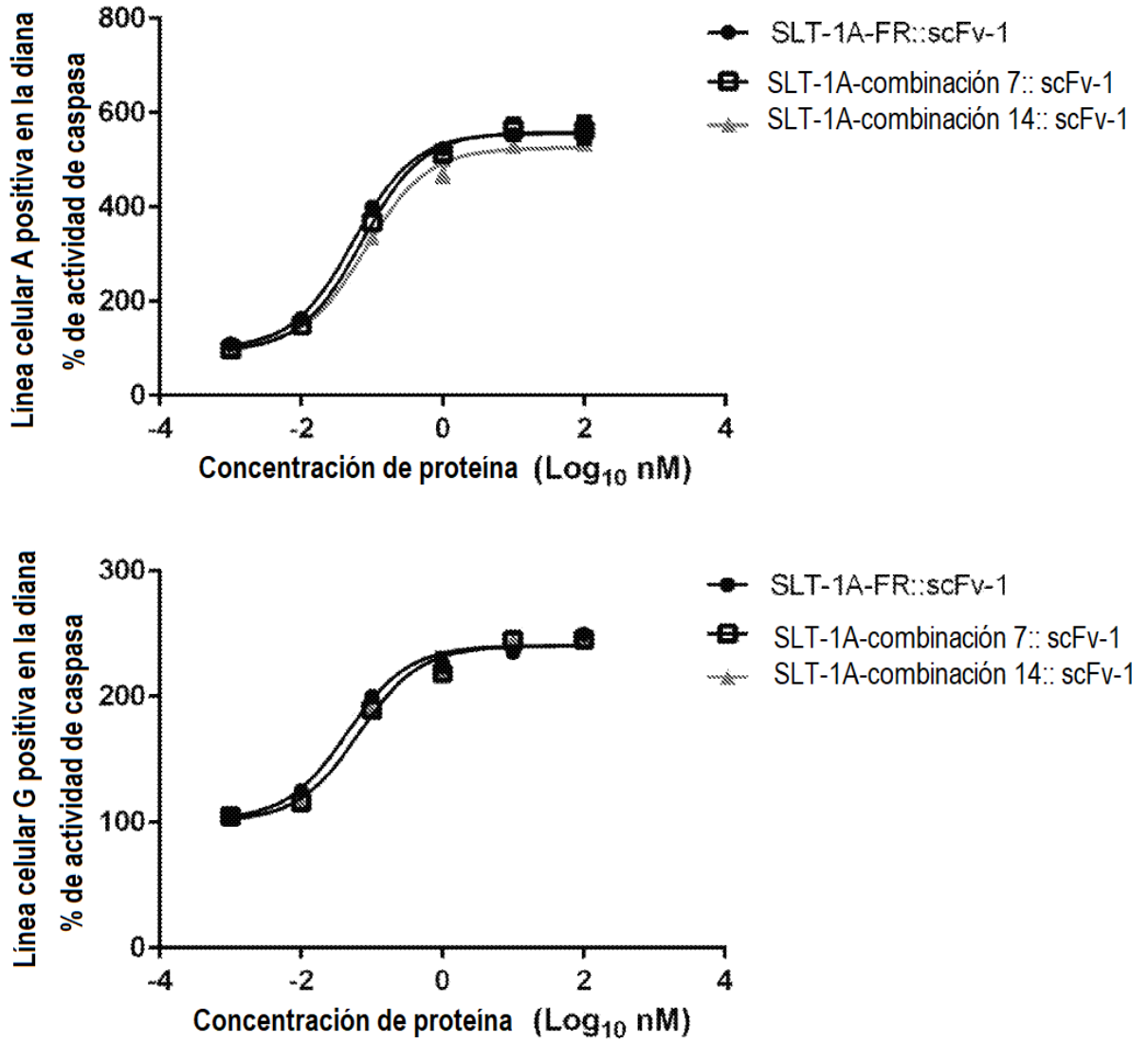


Figura 12: Actividad de caspasa inducida por una molécula de reconocimiento celular de ejemplo de la invención

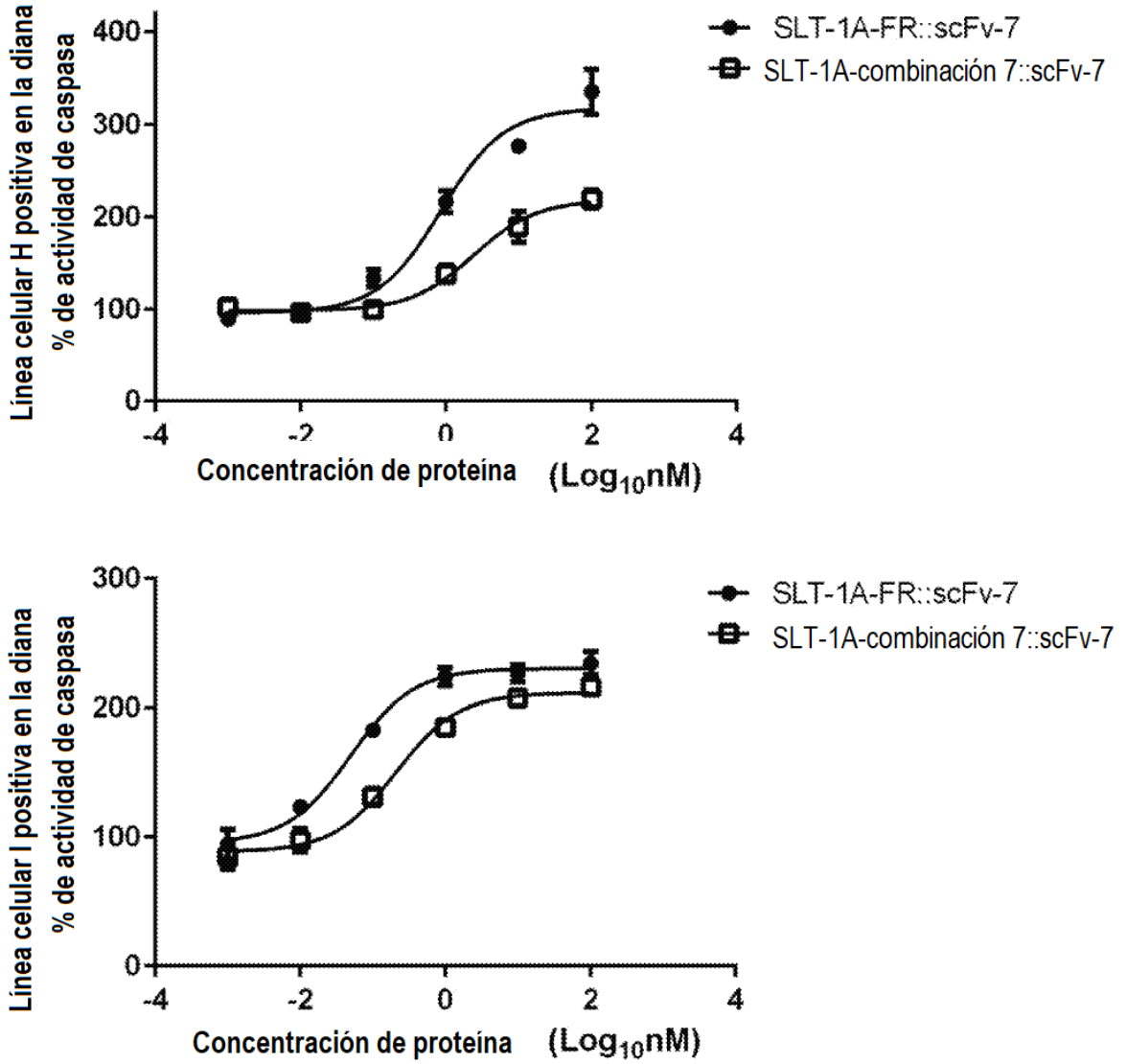


Figura 13. Antigenicidades relativas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención en condiciones desnaturalizantes en transferencias Western

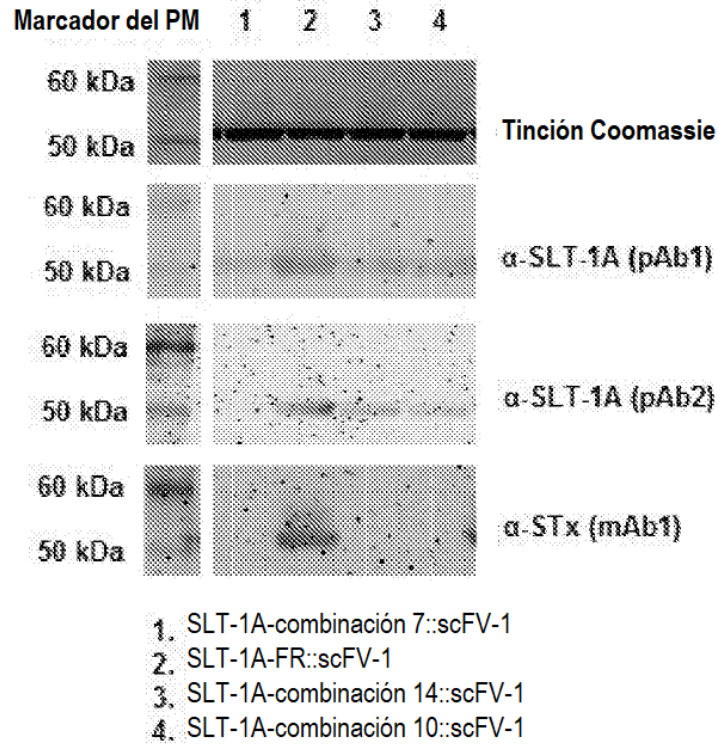


Figura 14. Antigenicidades relativas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención en condiciones nativas en ELISA

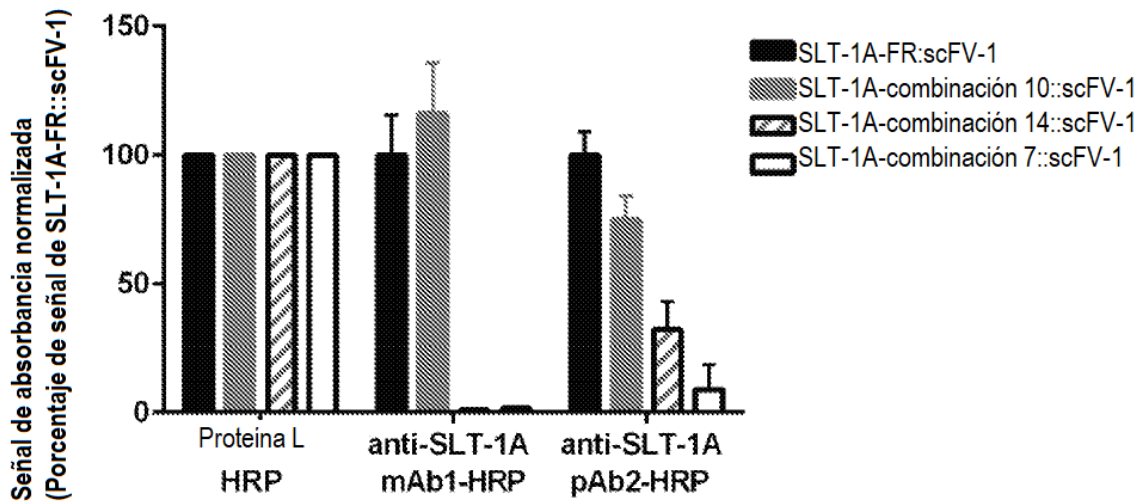


Figura 15. Inmunogenicidades relativas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención

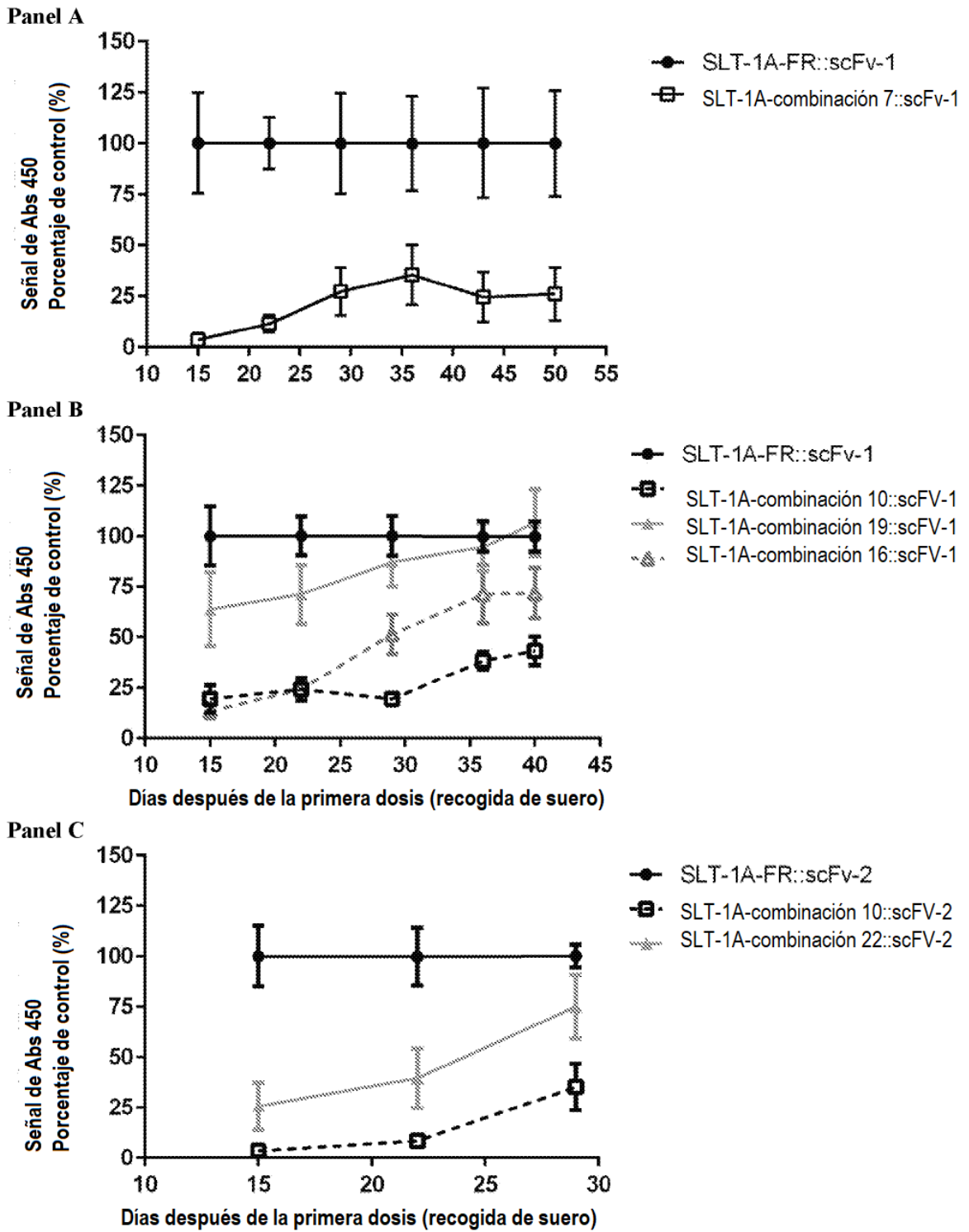
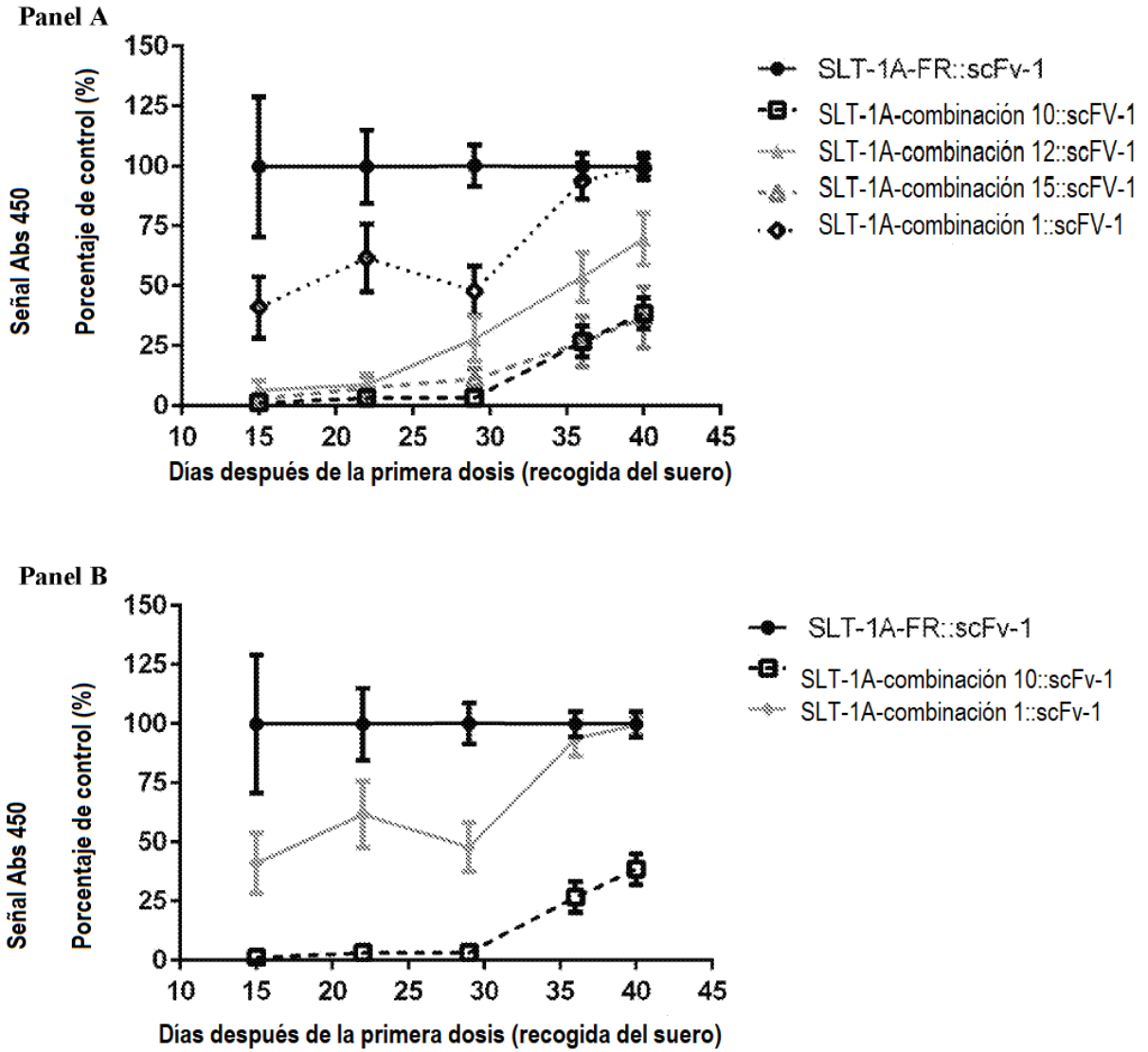


Figura 16. Inmunogenicidades relativas de moléculas de reconocimiento celular de ejemplo de la invención



**Figura 17. Análisis de escisión por furina *in vitro*:** Alteración del motivo de escisión por furina en el extremo carboxi terminal de la región del fragmento A1 de la toxina Shiga da lugar a la resistencia a la escisión proteolítica por furina humana en comparación con un polipéptido efector de la toxina Shiga de tipo salvaje

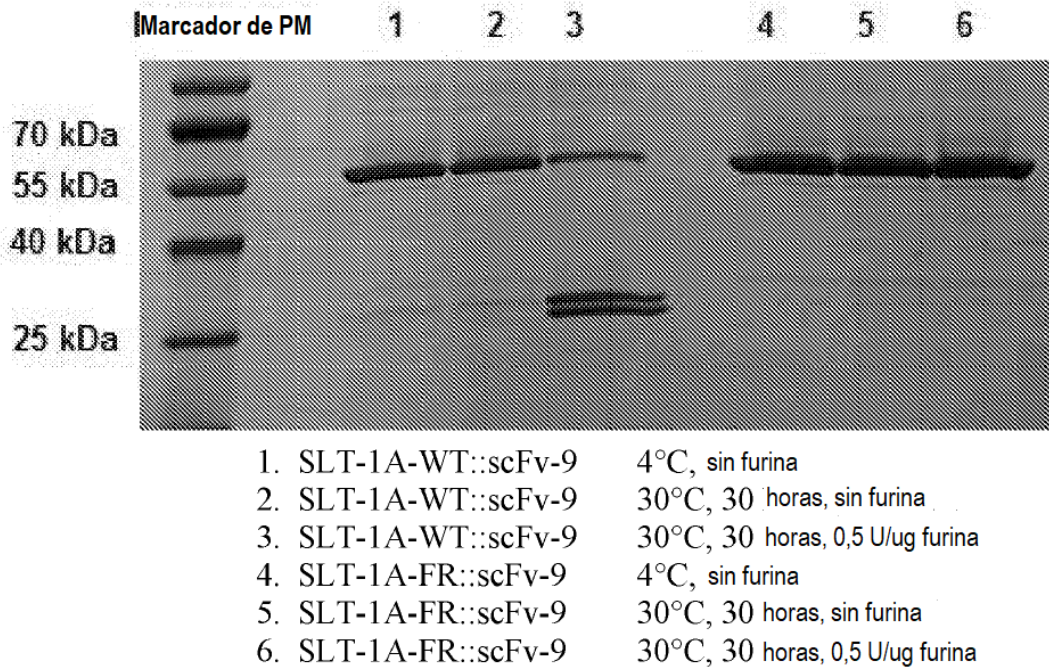


Figura 18. Afinidades de unión celular y especificidades de una molécula de reconocimiento celular de ejemplo de la presente invención

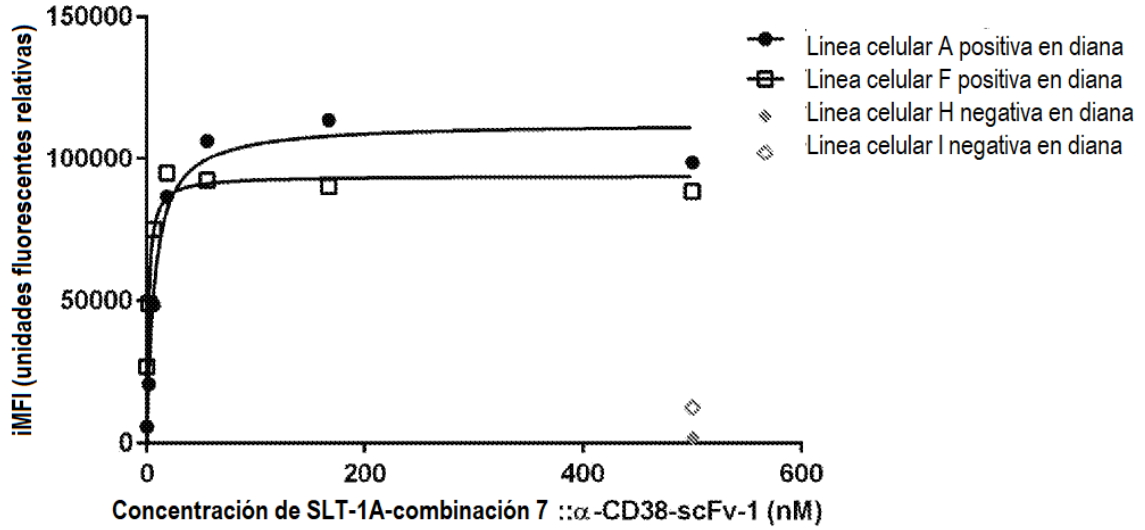


Figura 19. Resultados de xenoinjerto de tumor diseminado: El tratamiento con SLT-1A-combinación 7::alfaCD38-scFv-1 redujo las cargas de tumor diseminado *in vivo*

