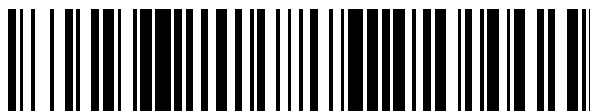


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 911 075**

51 Int. Cl.:

C07K 14/54 (2006.01)
C07K 14/21 (2006.01)
C07K 14/28 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 47/64 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2019** **E 19207825 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.03.2022** **EP 3650037**

54 Título: **Constructos de administración para transcitosis y métodos relacionados**

30 Prioridad:

07.11.2018 US 201862756889 P
08.03.2019 WO PCT/US2019/021474
16.08.2019 US 201962888133 P
16.08.2019 US 201962888238 P
11.09.2019 WO PCT/US2019/050708

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2022

73 Titular/es:

APPLIED MOLECULAR TRANSPORT INC.
(100.0%)
450 East Jamie Court
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

PORAT, AMIR;
SETO, ELBERT;
OLSON, CHARLES;
MRSNY, RANDALL J.;
MAHMOOD, TAHIR;
FENG, WEIJUN y
POSTLETHWAITE, SALLY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 911 075 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

Constructos de administración para transcitosis y métodos relacionados

5 ANTECEDENTES

El epitelio intestinal ha frustrado los esfuerzos para administrar por vía oral moléculas terapéuticas grandes, como las proteínas, porque las proteínas no pueden difundirse a través de la barrera epitelial intacta o atravesar la barrera a través de las uniones estrechas. Una vez captada por una célula epitelial, una proteína terapéutica puede introducirse en la vía de tráfico lisosomal destructiva o puede liberarse de nuevo en la luz intestinal. Esta incapacidad para transportarse fácilmente a través del epitelio intestinal puede ser un factor limitante en el desarrollo de formulaciones orales comercialmente viables, particularmente para tratamientos basados en polipéptidos.

La administración parenteral, como la administración intravenosa o subcutánea, puede ser una solución, pero estas vías de administración a menudo pueden crear efectos secundarios considerables, disminuir la eficacia terapéutica y reducir la comodidad del paciente, lo que puede afectar negativamente al cumplimiento. Hay una necesidad de composiciones y métodos mejorados para transportar agentes terapéuticos a través de un epitelio, por ejemplo, un epitelio intestinal.

Además, la purificación y el replegado de polipéptidos biológicamente activos para obtener polipéptidos estables, biológicamente activos y plegados correctamente con altos rendimientos y bajos niveles de endotoxinas todavía se considera uno de los aspectos más desafiantes para una producción rentable y eficiente en recursos de agentes terapéuticos biológicos (por ejemplo, polipéptidos). Por tanto, también hay una necesidad de métodos mejorados para la producción (fermentación, replegado, purificación y formulación) de tales moléculas biológicamente activas. La WO2015/171965 divulga moléculas de fusión derivadas de toxina choliX para administración oral de carga biológicamente activa. Hsu et al (Cancer Res Proceedings, AACR 107^o Annual Meeting, vol 60, 15 de julio de 2000, p3701-3705) analizan la vacunación contra la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) usando repeticiones de GnRH conjugadas con el dominio de unión al receptor tóxico. La WO2019/173787 divulga constructos de administración derivados de toxinas para administración oral.

SUMARIO

La invención proporciona un constructo de administración que comprende un portador acoplado a una IL-22 humana, en donde el portador consiste de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 o 9. La invención también proporciona un constructo de administración que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 17, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 17. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos un 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 17.

En algunos casos, la IL-22 humana consiste de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, el portador se acopla covalentemente o no covalentemente a la IL-22. En algunos casos, el portador se acopla covalentemente a la IL-22 a través de un espaciador. En algunos casos, el espaciador consiste de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13. En algunos casos, el constructo de administración consiste de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones, los constructos de administración de la invención son para su uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto, el método comprendiendo administrar al sujeto una cantidad eficaz de un constructo de administración descrito en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17). En algunos casos, la enfermedad inflamatoria es hepatitis, obesidad, enfermedad del hígado graso, inflamación del hígado o pancreatitis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reservoritis, proctitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra huésped, artritis reumatoide o psoriasis. En algunos casos, la enfermedad es la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

En algunas realizaciones, tras el contacto con una célula, el portador promueve la endocitosis o la transcitosis del constructo de administración. En algunas realizaciones, tras el contacto con la célula, el portador promueve la transcitosis del constructo de administración. En algunas realizaciones, la célula es una célula epitelial intestinal. En algunas realizaciones, la célula epitelial intestinal es una célula epitelial intestinal polarizada. El portador es una variante truncada de un polipéptido de choliX de origen natural o no natural. En algunas partes de la divulgación, IL-22 tiene por lo menos un 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 11 o 12.

En algunas realizaciones, el portador, por sí mismo, tiene un primer punto isoeléctrico (pI) y la IL-22, por sí misma, tiene un segundo punto isoeléctrico, en donde el primer punto isoeléctrico es por lo menos 1 unidad de pH, por lo menos 1,5 unidades de pH., por lo menos 1,7 unidades de pH, o por lo menos 2 unidades de pH por debajo del segundo punto isoeléctrico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el portador tiene un pI de entre 4,8 y 5,4,

entre 4,9 y 5,3, entre 5,0 y 5,2, como un pl de aproximadamente 5,1. En algunas realizaciones, el pl de la IL-22 está entre aproximadamente 6,8 y 7,4, como entre aproximadamente 6,9 y 7,3, entre aproximadamente 7,0 y 7,2, como aproximadamente 7,1. En algunas realizaciones, los constructos de administración se obtienen mediante cualquiera de los métodos descritos en la presente.

Los constructos de administración de la invención pueden producirse mediante métodos de replegado de un constructo de administración, el método comprendiendo: (i) poner en contacto los cuerpos de inclusión que comprenden el constructo de administración con una solución de solubilización que comprende un agente caotrópico para producir un constructo de administración soluble; (iii) poner en contacto el constructo de administración con una solución de replegado, en donde la solución de replegado comprende: arginina (de 0,75 M a 1,25 M); glicerol (del 2% al 20% v/v); cisteína (de 0,5 mM a 10 mM); y cistamina (de 0,2 mM a 10 mM); en donde la solución de replegado tiene un pH de entre 7,5 y 8,5.

En algunas realizaciones, la arginina está presente en la solución de replegado a una concentración de entre 0,9 M y 1,1 M; el glicerol está presente en la solución de replegado a una concentración de entre el 7% y el 13% (p/p); la cisteína está presente en la solución de replegado a una concentración de entre 1,5 mM y 6 mM; la cistamina está presente en la solución de replegado a una concentración de entre 0,6 mM y 3 mM; y la solución de replegado tiene un pH de entre 7,8 y 8,2.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las características novedosas de la divulgación se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente divulgación con referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la divulgación, y cuyos dibujos acompañantes:

La FIG. 1 muestra esquemáticamente una configuración que comprende una cámara apical por encima de una monocapa de células epiteliales y una cámara basal por debajo de dicha monocapa de células epiteliales. Para la permeabilidad apical a basolateral, se aplicaron artículos de prueba (por ejemplo, constructos de administración, cargas útiles, etc.) al lado apical (A) y se determinó la cantidad de material permeado (por ejemplo, transcitado) en el lado basolateral (B).

La FIG. 2 muestra que un constructo de administración (SEQ ID NO: 15), que incluye un portador (SEQ ID NO: 7) acoplado a una IL-22 (SEQ ID NO: 11) a través de un espaciador (SEQ ID NO: 13), transportó la carga útil de IL-22 a través de monocapas de células epiteliales intestinales Caco-2, polarizadas, intactas de una manera dependiente del tiempo (la cantidad de proteína en el sitio basolateral se midió 15, 30 y 45 minutos después de que el constructo de administración se aplicara a la membrana basal de la monocapa como se ha descrito anteriormente en la FIG. 1). Los datos muestran además que cuando el constructo de administración con un portador de la SEQ ID NO: 7 e IL-22 (SEQ ID NO: 11) se aplica a las células epiteliales Caco-2, cruzaron la monocapa de células epiteliales Caco-2 aproximadamente 2-3 veces más de IL-22 en comparación con cuando una IL-22 (SEQ ID NO: 12) no estaba acoplada a un portador.

La FIG. 3 muestra que un constructo de administración (SEQ ID NO: 15) dio como resultado que la IL-22 (SEQ ID NO: 11) fuese transportada a través de monocapas de células epiteliales intestinales SMI-100 intactas y polarizadas de una manera dependiente del tiempo (la cantidad de proteína en la cámara basolateral se midió a los 15, 30 y 45 minutos después de que se hubiese aplicado el constructo de administración a la membrana basal de la monocapa). Los datos muestran además que cuando el constructo de administración que incluye el portador con SEQ ID NO: 7 acoplado a IL-22 (SEQ ID NO: 11) se aplica a las células epiteliales SMI-100, cruzan la monocapa de células epiteliales SMI-100 aproximadamente 2-3 veces más IL-22 en comparación con cuando una IL-22 (SEQ ID NO: 12) no estaba acoplada a un portador.

La FIG. 4 demuestra que un constructo de administración (SEQ ID NO: 15) que incluye un portador (SEQ ID NO: 7) acoplado a una IL-22 (SEQ ID NO: 11) a través de un espaciador (SEQ ID NO: 13) da como resultado que IL-22 sea transportada en cantidades significativas a través de un epitelio intestinal intacto y polarizado *in vivo*. El sitio apical del epitelio intestinal está resaltado por la flecha blanca N° 1. La *lamina propria* se abrevia como "1.p." La membrana basal externa del epitelio polarizado está resaltada por la flecha blanca N° 2. La localización de IL-22 se indica con la flecha blanca N° 3).

La FIG. 5A demuestra la fosforilación de STAT3 en células B FL83 murinas en función de la concentración de agonista (en pM), donde el agonista es IL-22 humana recombinante (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) o IL-22 murina recombinante (rmIL-22; MAVLQKSMFSFLMGTAAASCLLLIALWAQE ANALPVNTRCKLEVSNFQQPYIVNRTFMLAKEASLADNNTDVR-LIGKLFGRGVSAKDQCYLKMQVLNFTLEDVLLPQSDRFQPYMQEVPFL TKLSNQLSSCHISGDDQNIQKNVR-RLKETVKKLGES GEIKAIGELDLLFMSLRNACV (SEQ ID NO: 30)). Los datos muestran que rhIL-22 y rmIL-22 indujeron la fosforilación de STAT3 de manera dependiente de la concentración, lo que demuestra que la proteína IL-22 humana puede unirse e inducir la transducción de señales a través de los receptores de IL-22 de ratón con tanta eficacia como la IL-22 de ratón.

La FIG. 5B demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 también indujeron la fosforilación de STAT3 en células murinas Hepa1-6.

La **FIG. 6A** demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 indujeron la fosforilación de STAT5 en células B FL83 murinas de una manera dependiente de la dosis, lo que demuestra que la proteína IL-22 humana puede unirse e inducir la transducción de señales a través de receptores de IL-22 de ratón con tanta eficacia como la IL-22 de ratón.

La **FIG. 6B** demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 también indujeron la fosforilación de STAT5 en células murinas Hepa1-6.

La **FIG. 7A** muestra una descripción general de un diseño de estudio *in vivo* y un cronograma para comparar la administración peroral (p.o.) del constructo de administración con la SEQ ID NO: 15 a dos niveles de dosis una vez al día, 1 mg/kg y 30 mg/kg, y una administración una vez al día (intraperitoneal (i.p.)) de rhIL-22 a 4 mg/kg. El estudio *in vivo* se realizó en ratones C57BL/6 hembra alimentados con comida normal, de 8 a 10 semanas de edad, ~23 g. La colitis se indujo químicamente con dextrano sulfato de sodio (DSS) al 2,5% en agua para beber, ad libitum. Los criterios de valoración del estudio incluyeron el cambio porcentual en el peso corporal, el índice de actividad de la enfermedad, la longitud y el peso del colon y la histopatología.

La **FIG. 7B** muestra las características de los grupos experimentales y de control usados en el estudio descrito en la **FIG. 7A**.

La **FIG. 8A** muestra el porcentaje (%) de cambio en el peso corporal de los animales en el día 10 del estudio en relación con el día 0 de los varios grupos experimentales y de control. El cambio de peso corporal de referencia (día 0 frente a 10) por rhIL-22 con la SEQ ID NO: 12 o el constructo de administración con la SEQ ID NO: 15 con respecto al vehículo no fue significativo según se evaluó por ANOVA de 1 vía. El control de modelo positivo (ciclosporina) CsA fue significativamente diferente con respecto al vehículo según se evaluó mediante un ANOVA de 1 vía.

La **FIG. 8B** muestra el cambio en el peso corporal de los animales experimentales y de control durante los primeros 10 días de estudio. El peso corporal medio del grupo CsA durante el período de estudio mejoró significativamente con respecto al control de vehículo del día 6 al día 10 según se evaluó mediante ANOVA de 2 vías (*, **, ***) el peso corporal de rhIL-22 (i.p.) mejoró significativamente con respecto al control de vehículo en el día 10 según se evaluó por ANOVA de 2 vías (*), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

La **FIG. 9** muestra los resultados de los experimentos ELISA en plasma para determinar los niveles en plasma de IL-22. Los resultados muestran que las concentraciones en plasma de rhIL-22 tendieron a aumentar los niveles en plasma después de la administración por alimentación forzada oral de dosis de 1 y 30 mg/kg de la estructura de administración con la SEQ ID NO: 15 de manera dependiente de la dosis (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Media + SEM, n = 2 no tratado, 5 vehículo, 5 CsA, 10 otros)

La **FIG. 10A** muestra una descripción general de un estudio *in vivo* de dosis única diseñado para identificar biomarcadores de acoplamiento al objetivo después de una dosificación individual (dosificación aguda) de rhIL-22 en ratones sanos CD-1.

La **FIG. 10B** muestra una descripción general de un estudio *in vivo* de dosis múltiples (dosificación subcrónica) diseñado para identificar biomarcadores de acoplamiento al objetivo después de dosis individuales y múltiples de rhIL-22 en ratones CD-1 sanos.

La **FIG. 11A** muestra que la administración aguda y subcrónica de rhIL-22 aumenta la concentración de IL-22 consistentemente.

La **FIG. 11B** muestra algunos parámetros farmacocinéticos medidos durante los experimentos de dosificación aguda y subcrónica descritos en la **FIG. 11A**.

La **FIG. 12A** muestra la concentración de proteína C reactiva murina (mCRP) circulante inducida en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Los resultados muestran un aumento dependiente del tiempo en la mCRP circulante en ambos grupos de estudio.

La **FIG. 12B** muestra el cambio de veces de la concentración de mCRP en plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 12C** muestra el cambio de veces de la concentración de mCRP en plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 13A** muestra la concentración de proteína A amiloide sérica murina (mSAA) circulante inducida en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Los resultados muestran un aumento dependiente del tiempo en la mSAA circulante en ambos grupos de estudio, con concentraciones de picos en plasma aproximadas aproximadamente 8 horas después de la administración.

La **FIG. 13B** muestra el cambio de veces de la concentración de mSAA en plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 13C** muestra el cambio de veces de la concentración de mSAA en plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 14A** muestra la proteína $3\beta\beta$ derivada de los islotes (Reg $3\beta\beta$) de regeneración circulante inducida en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 14B** muestra el cambio de veces de la concentración en plasma de Reg $3\beta\beta$ 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 14C** muestra el cambio de veces de la concentración en plasma de Reg $3\beta\beta$ después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 15** ilustra un diagrama de flujo que muestra cómo la capacidad de fabricación mejorada puede permitir la traducción clínica.

La **FIG. 16** ilustra que la SEQ ID NO: 15 es una proteína de fusión heteróloga que comprende un dominio portador (SEQ ID NO: 7) enlazado a través de un espaciador (SEQ ID NO: 13) a la interleucina-22 (IL-22, SEQ ID NO: 11). Las proteínas de fusión heterólogas pueden secuestrarse en cuerpos de inclusión (IB) de *E. coli* y, por lo tanto, requieren replegado y/o purificación.

La **FIG. 17** ilustra un diagrama de flujo que resume el replegado, la purificación y la formulación de las proteínas de fusión heterólogas descritas en la presente, como, por ejemplo, las SEQ ID NO: 14-21, y proteínas de fusión que comprenden un portador de la SEQ ID NO: 1-9, 22 o 23.

La **FIG. 18** ilustra la optimización iterativa para la eficiencia de replegado mejorada del constructo de la SEQ ID NO: 15.

La **FIG. 19** es una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) que muestra la señal de la proteína replegada optimizada (SEQ ID NO: 15) y los agregados de proteínas que tienen masas moleculares más altas y, por tanto, tiempos de retención más bajos.

La **FIG. 20** ilustra una SDS-PAGE ejemplar de la proteína replegada inicial y optimizada (SEQ ID NO: 15).

Las **FIGS. 21A-21B** ilustran una cromatografía de exclusión por tamaño después de una primera purificación en columna de la SEQ ID NO: 15 usando resina de intercambio aniónico NH2-750F. La **FIG. 21A** ilustra una cromatografía de exclusión por tamaño después de una primera purificación en columna de la SEQ ID NO: 15 usando resina de intercambio aniónico NH2-750F con un volumen de columna de 10 ml y una altura de lecho de 20 cm. La **FIG. 21B** ilustra una cromatografía de exclusión por tamaño después de una primera purificación en columna de la SEQ ID NO: 15 utilizando resina de intercambio aniónico NH2-750F con un volumen de columna de 4,6 l y una altura de lecho de 30 cm.

Las **FIGS. 22A-22B** ilustran una cromatografía de exclusión por tamaño después de una segunda purificación en columna de la SEQ ID NO: 15 usando resina de hidroxiapatita CaPure®. La **FIG. 22A** ilustra una cromatografía de exclusión por tamaño después de una segunda purificación en columna de la SEQ ID NO: 15 usando resina de hidroxiapatita Ca⁺⁺Pure con un volumen de columna de 5 ml, una altura de lecho de 10 cm y un gradiente del 0-25% B, 25° C. La **FIG. 22B** ilustra una cromatografía de exclusión por tamaño después de una segunda purificación en columna de la SEQ ID NO: 15 usando resina de hidroxiapatita CaPure® con un volumen de columna de 800 ml, una altura de lecho de 21 cm y un gradiente del 0-25% B, 25CV. Para cada figura una SDS-PAGE correspondiente de muestras de las diferentes fracciones eluidas de la resina CaPure®.

Las **FIGS. 23A-23B** ilustran un cromatograma de cromatografía líquida-espectrofotometría de masas (LC-MS) después de la purificación de proteínas de fusión heterólogas. La **FIG. 23A** ilustra un cromatograma LC-MS de la SEQ ID NO: 17. El pico 1 ilustra la SEQ ID NO: 17 replegada correctamente. La **FIG. 23B** ilustra un cromatograma LC-MS de la SEQ ID NO: 15. El pico 1 ilustra la SEQ ID NO: 15 replegada corregida. El pico 2 ilustra la SEQ ID NO: 15 con la metionina terminal escindida (ilustrada por la SEQ ID NO: 20). El pico 3 ilustra la SEQ ID NO: 15 con la metionina terminal escindida (se ilustra mediante la SEQ ID NO: 20) y la acetilación del aminoácido N-terminal resultante.

La **FIG. 24** ilustra la descripción general del estudio del **EJEMPLO 16** para evaluar el transporte del constructo de administración que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 15 a través del epitelio intestinal y hacia la circulación después de la administración oral (abreviada en la presente como P.O.) del constructo.

Las **FIGS. 25A-25B** ilustran gráficos que muestran la concentración en plasma de IL-22 en función del tiempo después de la administración del constructo de administración de la SEQ ID NO: 15. La **FIG. 25A** ilustra la concentración en plasma total de IL-22 en función del tiempo después de la administración del constructo de administración de la SEQ ID NO: 15. La **FIG. 25B** ilustra la concentración en plasma de IL-22BP en función del tiempo después de la administración del constructo de administración de la SEQ ID NO: 15.

La **FIG. 26A** (vehículo) y la **FIG. 26B** (SEQ ID NO: 15) son gráficos que muestran la concentración en plasma de IL-22 en función del tiempo para ratones individuales.

Las **FIGS. 27A-27D** ilustran que la longitud del espaciador y el acoplamiento de la carga útil al extremo N- o C-terminal de un portador no afectan significativamente a la actividad biológica de la carga útil. La **FIG. 27A** ilustra que la longitud de varios espaciadores de aminoácidos no afectó a la inducción de la dimerización del receptor de IL-22. La **FIG. 27B** ilustra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 al extremo N- o C-terminal de un portador no afectó a la inducción de la dimerización de IL-22. La **FIG. 27C** ilustra que la longitud de varios espaciadores de aminoácidos no afectó a la inducción de la activación de pSTAT3. La **FIG. 27D** ilustra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 al extremo N- o C-terminal de un portador no afectó a la inducción de la activación de pSTAT3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los siguientes términos se analizan para ilustrar los significados de los términos como se usan en esta memoria descriptiva, además de la comprensión de estos términos por los expertos en la técnica. Como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta declaración sirva como base antecedente para el uso de terminología exclusiva como "únicamente", "solo" y similares en relación con la enumeración de los elementos de las reivindicaciones o el uso de una limitación "negativa".

Ciertos intervalos o números se presentan en la presente con valores numéricos precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" como se usa en la presente significa más o menos el 1%, 2%, 3%, 4% o 5% del número al que se refiere el término. Como se usan en la presente, los términos "sujeto" e "individuo" se usan indistintamente y pueden ser cualquier animal, incluyendo mamíferos (por ejemplo, un animal humano o no humano).

Como se usa en la presente, los términos "tratar", "tratando" o "tratamiento" y otros equivalentes gramaticales incluyen aliviar, reducir o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad o afección, mejorar, prevenir o reducir la apariencia, gravedad o frecuencia de uno o más síntomas adicionales de una enfermedad o afección, mejorar o prevenir las causas subyacentes de uno o más síntomas de una enfermedad o afección, inhibir la enfermedad o afección como, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, provocar la regresión de la enfermedad o afección, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o inhibir los síntomas de la enfermedad o afección ya sea profiláctica y/o terapéuticamente.

Como se describe en la presente, el término "porcentaje (%)" de identidad de secuencia" y los términos relacionados con el mismo, en el contexto de las secuencias de aminoácidos, es el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que están dentro del conocimiento en la técnica, por ejemplo, usando software informático disponible públicamente como software Clustal Omega, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se están comparando.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los péptidos también incluyen esencialmente cualquier poliaminoácido que incluye, pero no se limita a, miméticos de péptidos como aminoácidos unidos por un enlace éter en lugar de un enlace amida.

Cargas útiles y constructos de administración

En la presente se proporcionan constructos de administración capaces de transportar IL-22 a través de células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales intestinales polarizadas) y en la *lamina propria* a través de transcitos. El portador puede ser capaz de transportar la IL-22 a través de células epiteliales polarizadas (por ejemplo, células epiteliales intestinales polarizadas) usando vías de tráfico endógenas. La utilización de vías de tráfico endógenas, en contraposición al uso de la difusión pasiva, puede permitir que el portador transporte la carga útil heteróloga de manera rápida y eficiente a través de las células epiteliales sin alterar la función de barrera de estas células o la actividad biológica de la carga útil heteróloga.

El portador puede derivar de un polipéptido Cholix secretado por *Vibrio Cholerae*. El portador derivado de un polipéptido Cholix puede ser de origen natural o no natural. Por ejemplo, un polipéptido Cholix de origen no natural puede consistir de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 (un ejemplo de Cholix¹⁻⁶³⁴) (**TABLA 1**). El portador derivado de un polipéptido Cholix puede ser una variante truncada y/o mutada de un polipéptido derivado de Cholix. Un portador de la presente puede comprender una sustitución V1L. Dicho de otra manera, en algunas realizaciones, el portador relacionado con cholix tiene un aminoácido de leucina en la posición "1". (La posición 1 se refiere al primer aminoácido de las variantes que no tienen una metionina N-terminal o la segunda posición en las variantes que incluyen una metionina N-terminal. En otras palabras, al determinar la longitud de un portador, se ignora una metionina N-terminal, si la hay). En algunas realizaciones, los portadores que comprenden la sustitución de V1L experimentan una escisión reducida o eliminada del aminoácido N-terminal. En algunas realizaciones, los portadores que comprenden la sustitución de V1L experimentan una acetilación reducida o eliminada del aminoácido N-terminal. Un portador proporcionado en la presente puede tener una actividad de ribosilación de ADP reducida (por ejemplo, por lo menos un 50% reducida) o suprimida (por ejemplo, ribosilación del factor de elongación 2) con respecto a una variante de Cholix de origen natural. En algunas realizaciones, el portador puede comprender una metionina N-terminal. En otras realizaciones, no hay metionina N-terminal.

La interleucina 22 (IL-22) es una interleucina 22 humana. La IL-22 humana puede tener la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 10 (IL-22¹⁻¹⁷⁹) o la SEQ ID NO: 11 (IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). Una IL-22 en la presente puede incluir además una metionina en su extremo N-terminal, por ejemplo, cuando dicha proteína IL-22 se expresa en bacterias. En un caso, una IL-22 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). Una IL-22 en la presente puede incluir además una metionina en su extremo N-terminal, por ejemplo, cuando dicha proteína IL-22 se expresa en bacterias. En un caso, una IL-22 tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹). La IL-22 puede comprender, consistir esencialmente de, o consistir de la SEQ

ID NO: 10, o una secuencia de aminoácidos que tenga por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la misma o fragmento de la misma. La IL-22 puede comprender, consistir esencialmente de, o consistir de la SEQ ID NO: 11 (IL-22³⁴⁻¹⁷⁹), que es una forma secretada de IL-22, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia con la misma o fragmento de la misma. Una IL-22 puede incluir una metionina en su extremo N-terminal, por ejemplo, cuando dicha proteína IL-22 se expresa en bacterias. Tal IL-22 puede consistir, consistir esencialmente de, o comprender una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 12 (M+IL-22³⁴⁻¹⁷⁹).

Tal como se hace referencia en la presente, "transcitosis" se refiere al tráfico de la molécula de fusión a través de una célula epitelial polarizada. Dicho tráfico permite la liberación de la carga biológicamente activa desde la membrana basolateral de la célula epitelial polarizada. El proceso de transcitosis puede implicar interacciones del portador con uno o más receptores y/o proteínas en las superficies apicales y/o basales, así como dentro de una célula del epitelio (por ejemplo, una célula epitelial intestinal polarizada). El portador puede ser capaz de transportar la IL-22 a través de un epitelio sin alterar el epitelio, el portador y/o la función biológica y/o terapéutica de la IL-22.

Un portador puede acoplarse a IL-22 covalente o no covalentemente y directa o indirectamente. La IL-22 puede acoplarse directamente al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del portador. En los casos en los que el soporte se acopla covalentemente a la IL-22, el portador puede acoplarse a IL-22 a través de un espaciador (también denominado referido en la presente como conector). El espaciador puede comprender por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más residuos de aminoácidos. Los residuos de aminoácidos espaciadores pueden ser, por ejemplo, glicina, serina y/o triptófano. Un espaciador puede ser un espaciador escindible o no escindible. Un espaciador escindible puede ser escindible por una enzima o de manera dependiente del pH.

Los ejemplos de espaciadores contemplados en la presente incluyen secuencias de oligopéptidos como S, (GS)_x, (GGS)_x, (GGGS)_x (SEQ ID NO: 27), (GGGGGS)_x (SEQ ID NO: 28) o (GGGGGS)_x (SEQ ID NO: 29), donde x = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15. En algunos casos, un espaciador consiste de, consiste esencialmente de, o comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 13 ((G4S)₃). (GGGGSGGGSGGGGS). En algunos casos, un espaciador consiste, consiste esencialmente de, o comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 31 ((G4S)₅). (GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS). En algunos casos, un constructo de administración comprende una carga útil terapéutica y un portador que no están enlazados covalentemente (por ejemplo, a través de interacciones iónicas, interacciones de van der Waals, interacciones π-π, etc.). Un portador puede comprender además una o más características, elementos, aminoácidos, o modificaciones en su extremo N-terminal y/o extremo C-terminal. Por ejemplo, algunas realizaciones incluyen una metionina N-terminal en el extremo N-terminal del portador. También pueden estar presentes otras modificaciones (por ejemplo, acetilación), incluyendo modificaciones para la expresión en un sistema heterólogo.

Un constructo de administración en la presente puede tener una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o 17 (ejemplos de M+Cholix¹⁻²⁶⁶-(G4S)₃-IL-22³⁴⁻¹⁷⁹) (**TABLA 1**). Tales constructos de administración ejemplares transportan IL-22 a través de células epiteliales intestinales polarizadas intactas y hacia la *lamina propria*.

Un esquema del portador, espaciador y carga útil de una proteína de fusión de origen no natural que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 se ilustra en **FIG. 16**.

La **TABLA 1** muestra secuencias de aminoácidos ejemplares de moléculas biológicamente activas usadas en combinación con los métodos divulgados en la presente.

TABLA 1-Secuencias de aminoácidos ejemplares

Categoría	SEQ ID NO	Secuencia de Aminoácidos
Cholix ¹⁻⁶³⁴	SEQ ID NO: 1	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV LYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSALAAH RVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVAT RILFSLDSDVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGRMV TQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLF CPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQ GVTNWTYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRARDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETIG WDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPP YKERKDELK
Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 2	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV LYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSALAAH RVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVAT RILFSLDSDVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGRMV TQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA

(continuación)

5	Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 3	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV LYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKT QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG
10			
15			
20	(V1L)-Cholix ¹⁻³⁸⁶	SEQ ID NO: 4	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV LYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKT QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAH RVCVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVAT RILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGRMV TQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
25			
30			
35	(V1L)-Cholix ¹⁻²⁶⁶	SEQ ID NO: 5	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV LYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKT QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG
40			
45			

(continuación)

5		MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG
		VLYYSMTINDEQNEDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHV
		NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP
		GEDSPASIKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQW
10	SEQ ID NO: 6	KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHHR
		WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
15		GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSAL
		AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF
		VATRILFSLDVSFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP
20		GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
25		MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG
		VLYYSMTINDEQNEDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHV
		NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP
		GEDSPASIKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQW
30	SEQ ID NO: 7	KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHHR
		WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
		GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG
35		MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG
		VLYYSMTINDEQNEDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHV
		NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP
40		GEDSPASIKISVDELDDQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQW
		KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHHR
45	SEQ ID NO: 8	WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
		GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSAL
		AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF
50		VATRILFSLDVSFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP
		GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA

(continuación)

5	M+(V1L)-Cholix ¹⁻²⁶⁸	SEQ ID NO: 9	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG VLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHVY NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP GEDSPASIKISVDELQQRNIEVPKLYSIDLDNQTLEQW KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKKR WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG
10	IL-22 ¹⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 10	MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSH CRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEK LFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQ EVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKL GESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
15	IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 11	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDV RLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRF QPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLK DTVKKLGESEGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
20	M+IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 12	MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTD VRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDR FQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLK DTVKKLGESEGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
25	(G4S) ₃	SEQ ID NO: 13	GGGGSGGGGSGGGGS

(continuación)

5		MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG
		VLYYSMTINDEQNEDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHV
10		NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI
		GEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLQW
15	M+Cholix ¹⁻³⁸⁶ - (G4S)3-IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 14
		KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKR
20		WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
		GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSAL
25		AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLF
		VATRILFSLDVSFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNP
30		GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAGG
		GGSGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFML
35		AKEASLADNNTDVRLLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLN
		FTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGD
40		DLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRN
		ACI
45		MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG
		VLYYSMTINDEQNEDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHV
50		NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI
		GEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLQW
		KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKR
		WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
		GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSG
		GGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEA
		SLADNNTDVRLLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLE
		EVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI
		QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

(continuación)

5			MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG
			VLYYSMTINDEQNEDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
			NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI
			GEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLQW
10			KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHHR
			WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
			GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSAL
15	M+(V1L)-Cholix ¹⁻³⁸⁶ (G4S) ₃ -IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 16	AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF
			VATRILFSLDVSFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP
20			GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAGG
			GGSGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFML
			AKEASLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLN
25			FTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGD
			DLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRN
30			ACI
			MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG
			VLYYSMTINDEQNEDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV
35			NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI
			GEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLQW
			KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHHR
40	M+(V1L)-Cholix ¹⁻²⁶⁶ (G4S) ₃ -IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 17	WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG
			GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSG
			GGGSGGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEA
45			SLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLE
			EVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI
50			QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

(continuación)

5	Cholix ¹⁻³⁸⁶ -(G4S) ₃ -IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 18	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV
			LYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN
			QDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE
			DSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT
10			QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA
			HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY
15			ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAH
			RVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVAT
			RILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMV
20			TQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAAGGGGSG
			GGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEA
			SLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLE
25			EVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI
			QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
30			LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV
			LYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN
			QDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE
35			DSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT
	(V1L)-Cholix ¹⁻³⁸⁶ -(G4S) ₃ -IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 19	QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA
			HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY
40			ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAH
			RVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVAT
45			RILFSLDSDVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMV
			TQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAAGGGGSG
			GGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEA
			SLADNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLE
50			EVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI
			QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

55

(continuación)

5			VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV
			LYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVN
			QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE
			DSPASIKISVDELDDQQRNIIEVVKLYSIDLDNQTLEQWKT
10		SEQ	QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA
		ID	HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY
		NO:	ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGG
15		20	SGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLA
			DNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV
			FPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQR
20			NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
25			LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV
			LYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVN
			QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE
			DSPASIKISVDELDDQQRNIIEVVKLYSIDLDNQTLEQWKT
30		SEQ	QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA
		ID	HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY
		NO:	ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGG
35		21	SGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLA
			DNNTDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEV
40			FPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQR
			NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

45

(continuación)

(V1L)-Cholix ¹ - 634	SEQ ID NO: 22	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV LYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYVN QDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSALAAH RVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVAT RILFSIILDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLF CPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQ GVTNWTYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARI KEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAAEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPP YKERKDELK
M+(V1L)-Cholix ¹⁻⁶³⁴	SEQ ID NO: 23	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG VLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHYV NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP IGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQW KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKR WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSAL AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF VATRILFSIILDSVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADI LSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVI TPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVA AQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYR TNTPLENAAEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDET VIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTK PPYKERKDELK

(continuación)

5	Cholix ¹⁻²⁸⁶ -(G4S)3-IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 24	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV LYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVN QDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGG SGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLA DNNTDVR LIGELKFHGVMSERCYLMKQVLNFTLEEV LPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQR NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
10			
15			
20			
25			
30			
35	(V1L)-Cholix ¹⁻²⁸⁶ -(G4S)3-IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 25	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGV LYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVN QDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKT QGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSY ETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGG SGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLA DNNTDVR LIGELKFHGVMSERCYLMKQVLNFTLEEV LPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQR NVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
40			
45			
50			
55			
60			
65	M+Cholix ¹⁻²⁸⁶ -(G4S)1-IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 32	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG VLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP IGEDSPASIKISVDELDDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQW KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKR WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSA PISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVR LIGELKFHGVMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQ PYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDT VKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

(continuación)

5	M+Cholix ¹⁻²⁶⁶ (G4S)5-IL-22 ³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 33	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG VLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV NQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP GEDSPASIKISVDELDDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQW
10			KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKR WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYIT NRTFMLAKEASLADNNTDVRLLIGEKLFGHGVSMSERCYL MKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLS TCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDL LFMSLRNACI
25			MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTD VRLIGEKLFGHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDR FQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLK DTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIGGGGSVEEA LNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYS MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAP FGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVP IGEDSPA SIKISVDELDDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNV SFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA GTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG

45

(continuación)

5 10 15 20 25 M+Cholix¹⁻³⁸⁶ (G4S)1-IL-22³⁴⁻¹⁷⁹	SEQ ID NO: 35	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEG VLYYSMTINDEQNDIKDEDEKGESIITIGEFATVRATRHVY NQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQW KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKR WAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFG GSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSGKNAMSAL AAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLF VATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAAGG GGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNN TDVRLIGEKLFGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQS DRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQK LKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
30 35 Cholix Consensus Sequence	SEQ ID NO: 26	X1-E-X3-X4-L-X6-I-F-D-E-C-R-S-P-C-X16-L-T-P-E-X21-G- K-X24-I-Q-S-K-L-X30-I-P-X33-D-V-V-L-D-E-G-V-L-Y-Y-S- M-T-I-N-D-E-Q-N-D-I-X56-D-E-X59-K-G-E-S-I-I-T-X67-G- E-F-A-T-X73-R-A-T-R-H-Y-V-X81-Q-D-A-P-F-G-V-I-X90-

(continuación)

5	L-D-I-T-T-E-N-G-T-K-X101-Y-S-X104-N-R-K-X108-X109-
10	E-F-X112-I-X114-W-L-V-X118-X119-G-E-D-S-P-A-S-I-K-I-
15	S-X131-D-E-X134-D-Q-X137-R-N-I-I-E-V-P-K-L-Y-S-I-D-L-
20	D-N-Q-T-L-E-Q-W-X160-X161-Q-G-N-V-X166-F-X168-V-
25	T-R-P-E-X174-X175-I-A-I-S-W-P-S-V-S-Y-X186-A-A-X189-
30	K-X191-G-X193-R-H-K-R-W-A-X200-W-X202-T-X204-
35	X205-X206-X207-X208-X209-L-X211-X212-X213-X214-
40	X215-X216-X217-X218-X219-X220-X221-X222-X223-X224-
45	C-T-X227-G-X229-X230-W-X232-G-G-X235-Y-X237-T-V-
50	A-G-X242-P-X244-X245-I-X247-V-K-Q-G-X252-E-Q-K-
55	X256-V-E-Q-R-I-H-F-S-X265-X266-N-A-X269-X270-X271-
60	L-A-A-H-R-V-C-G-V-P-L-E-T-L-A-R-X288-R-K-P-R-X293-
65	L-X295-D-D-L-X299-C-X301-Y-X303-A-Q-X306-I-V-S-L-F-
	X312-A-T-R-X316-L-F-X319-H-X321-D-S-X324-F-T-L-N-L-
	X330-X331-Q-X333-P-X335-V-X337-E-R-L-X341-X342-
	X343-R-X345-I-N-E-X349-N-P-G-X353-V-X355-Q-V-L-T-
	X360-A-R-Q-I-Y-N-D-Y-V-T-X371-H-P-X374-L-X376-P-E-
	Q-T-S-A-X383-A-Q-A-A-D-I-L-S-L-X393-X394-P-D-X397-
	D-X399-X400-C-V-A-X404-X405-X406-D-Q-A-N-I-N-X413-
	E-S-R-S-G-R-S-Y-L-X423-E-N-R-A-V-I-T-X431-Q-G-V-T-
	N-W-T-Y-Q-E-L-X443-X444-X445-H-Q-X448-L-T-X451-E-
	X453-Y-V-F-V-G-Y-H-G-T-N-H-X465-A-A-Q-X469-I-V-N-
	R-I-X475-P-V-P-R-G-X481-X482-T-E-X485-E-X487-X488-
	W-G-G-X492-Y-V-X495-T-X497-A-X499-X500-X501-X502-
	X503-Y-X505-R-X507-X508-X509-G-T-X512-X513-X514-
	X515-X516-X517-T-X519-X520-X521-X522-X523-X524-R-
	G-V-M-L-X530-V-Y-X533-X534-X535-A-S-L-E-R-F-Y-R-
	X544-N-X546-X547-L-E-X550-X551-X552-X553-X554-
	X555-X556-X557-V-I-G-H-X562-L-P-L-R-N-E-A-F-T-G-
	X573-X574-X575-X576-X577-G-X579-X580-E-T-X583-I-G-
	W-D-X588-A-I-X591-X592-V-A-I-P-S-T-I-P-G-N-X603-Y-
	X605-X606-L-X608-X609-X610-E-E-A-X614-A-X616-E-Q-
	S-I-S-X622-K-P-P-Y-K-E-X629-X630-D-E-L-K;
	en donde X1 se selecciona del grupo que consiste de V y L; X3 se selecciona del grupo que consiste de E y D; X4 se selecciona del grupo que consiste de A y E; X6

(continuación)

		se selecciona del grupo que consiste de N y K; X16 se selecciona del grupo
5		que consiste de S y L; X21 se selecciona del grupo que consiste de P y L; X24 se selecciona del grupo que consiste de P y Q; X30 se selecciona del grupo que consiste de S y F; X33 se selecciona del grupo que consiste de S y G; X56 se selecciona del grupo que consiste de K y M; X59 se selecciona del grupo que consiste de D y G; X67 se selecciona del grupo que consiste de I y F; X73 se selecciona del grupo que consiste de V y I; X81 se selecciona del grupo que consiste de N y S; X90 se selecciona del grupo que consiste de H y N; X101 se selecciona del grupo que consiste de T y M; X104 se selecciona del grupo que consiste de Y y F; X108 se selecciona del grupo que consiste de E y D; X109 se selecciona del grupo que consiste de G y S; X112 se selecciona del grupo que consiste de A y T; X114 se selecciona del grupo que consiste de N y H; X118 se selecciona del grupo que consiste de P y I; X119 se selecciona del grupo que consiste de I y P; X131 se selecciona del grupo que consiste de V y I; X134 se selecciona del grupo que consiste de L y I; X137 se selecciona del grupo que consiste de Q y K; X160 se selecciona del grupo que consiste de K y E; X161 se selecciona del grupo que consiste de T y N; X166 se selecciona del grupo que consiste de S y F; X168 se selecciona del grupo que consiste de S y A; X174 se selecciona del grupo que consiste de H y Q; X175 se selecciona del grupo que consiste de N, S, SIAKQS, y SIAKQSIKQS; X186 se selecciona del grupo que consiste de K y N; X189 se selecciona del grupo que consiste de Q, E, y H; X191 se selecciona del grupo que consiste de E, N, y D; X193 se selecciona del grupo que consiste de S y A; X200 se selecciona del grupo que consiste de H y N; X202 se selecciona del grupo que consiste de H, L, F, y R; X204 se selecciona del grupo que consiste de G y T; X205 se selecciona del grupo que consiste de L y S; X206 se selecciona del grupo que consiste de A y P; X207 se selecciona del grupo que consiste de L, E, y K; X208 se selecciona del grupo que consiste de C y V; X209 se selecciona del grupo
10		
15		
20		
25		
30		que consiste de W, V, y T; X211 se selecciona del grupo que consiste de V y no aminoácido; X212 se selecciona del grupo que consiste de P y no aminoácido; X213 se selecciona del grupo que consiste de M, I, L, y no aminoácido; X214 se selecciona del grupo que consiste de D y no aminoácido; X215 se selecciona del grupo que consiste de A y no aminoácido; X216 se selecciona del grupo que consiste de I y no aminoácido; X217 se selecciona del grupo que consiste de Y y C; X218 se selecciona del grupo que consiste de N y F; X219 se selecciona del grupo que consiste de Y y F; X220 se selecciona del grupo que consiste de I y E; X221 se selecciona del grupo que consiste de T y D; X222 se selecciona del grupo que consiste de Q y P; X223 se selecciona del grupo que consiste de Q, E, y A; X224 se selecciona del grupo que consiste de N, L, y Q; X227 se selecciona del grupo que consiste de L y Y; X229 se selecciona del grupo que consiste de D y E; X230 se selecciona del grupo que consiste de N y D; X232 se selecciona del grupo que consiste de F, H, y Y; X235 se selecciona del grupo que consiste de S y A; X237 se selecciona del grupo que consiste de E y K; X242 se selecciona del grupo que consiste de T y I; X244 se selecciona del grupo que consiste de K, E, y G; X245 se selecciona del grupo que consiste de V y A; X247 se selecciona del grupo que consiste de T y M; X252 se selecciona del grupo que consiste de I y M; X256 se selecciona del grupo que consiste de P, T, y A; X265 se selecciona del grupo que consiste de K, Q, y N; X266 se selecciona del grupo que consiste de G y K; X269 se selecciona del grupo que consiste de M y I; X270 se selecciona del grupo que consiste de S y E; X271 se selecciona del grupo que consiste de A y T; X288 se selecciona del grupo que consiste de S y G; X293 se selecciona del grupo que consiste de D y Y; X295 se selecciona del grupo que consiste de T, P, y Q; X299 se selecciona del grupo que consiste de S y Q; X301 se selecciona del grupo que consiste de A y V; X303 se selecciona del grupo
35		
40		
45		
50		
55		que consiste de Q y N; X306 se selecciona del grupo que consiste de N y Q; X312 se selecciona del grupo que consiste de V y L; X316 se selecciona del grupo que consiste de I y M; X319 se selecciona del grupo que consiste de S y T; X321 se selecciona del grupo que consiste de L y I; X324 se selecciona del grupo que consiste de V y I; X330 se selecciona del grupo que consiste de D, E, y H; X331 se selecciona del grupo que consiste de E y G; X333 se selecciona del grupo que consiste de E y A; X335 se selecciona del grupo que consiste de E y A; X337 se selecciona del grupo que consiste de A y T; X341 se selecciona del grupo que consiste de S, D, y T; X342 se selecciona del grupo que consiste de D y A; X343 se selecciona del grupo que consiste de L y I; X345 se selecciona del grupo que consiste de R y Q; X349 se selecciona del grupo que consiste de N y D; X353 se
60		
65		

(continuación)

5		selecciona del grupo que consiste de M y V; X355 se selecciona del grupo que consiste de T y I; X360 se selecciona del grupo que consiste de V y I; X371 se selecciona del grupo que consiste de H y E; X374 se selecciona del grupo que consiste de G y L; X376 se selecciona del grupo que consiste de T y I; X383 se selecciona del grupo que consiste de G y S; X393 se selecciona del grupo que consiste de F y L; X394 se selecciona del grupo que consiste de C y Y; X397 se selecciona del grupo que consiste de A y T; X399 se selecciona del grupo que consiste de K, E, y G; X400 se selecciona del grupo que consiste de S, P, y H; X404
10		se selecciona del grupo que consiste de S y L; X405 se selecciona del grupo que consiste de N y D; X406 se selecciona del grupo que consiste de N y S; X413 se selecciona del grupo que consiste de I y V; X423 se selecciona del grupo que consiste de P y L; X431 se selecciona del grupo que consiste de P y Q; X443 se selecciona del grupo que consiste de E y D; X444 se selecciona del grupo que consiste de A y T; X445 se selecciona del grupo
15		que consiste de T y K; X448 se selecciona del grupo que consiste de A y T; X451 se selecciona del grupo que consiste de R y Q; X453 se selecciona del grupo que consiste de G y D; X465 se selecciona del grupo que consiste de V y A; X469 se selecciona del grupo que consiste de T, S, y N; X475 se selecciona del grupo que consiste de A, S, y T; X481 se selecciona del grupo que consiste de N y S; X482 se selecciona del grupo que consiste de N y D; X485 se selecciona del grupo que consiste de N, S, y K; X487 se selecciona del grupo que consiste de E, R, y K; X488
20		se selecciona del grupo que consiste de K, A, y E; X492 se selecciona del grupo que consiste de L y V; X495 se selecciona del grupo que consiste de A y S; X497 se selecciona del grupo que consiste de H y D; X499 se selecciona del grupo que consiste de E y S; X500 se selecciona del grupo que consiste de V y L; X501 se selecciona del grupo que consiste de A y N; X502 se selecciona del grupo que consiste de H y Y; X503 se selecciona del grupo que consiste de G y R; X505 se selecciona del grupo que consiste de A y T; X507 se selecciona del grupo que consiste de I y L; X508 se selecciona del grupo que consiste de K y Q; X509 se selecciona del grupo que consiste de E y K; X512 se selecciona del grupo que consiste de G y A; X513 se selecciona del grupo que consiste de E, D, y N; X514 se selecciona del grupo que consiste de Y, G, A, y N; X515 se selecciona del grupo que consiste de G y E; X516 se selecciona del grupo que consiste de L y G; X517
25		se selecciona del grupo que consiste de P y L; X519 se selecciona del grupo que consiste de R, P, y T; X520 se selecciona del grupo que consiste de A y E; X521 se selecciona del grupo que consiste de E y K; X522 se selecciona del grupo que consiste de R, Q, y K; X523 se selecciona del grupo que consiste de D, K, y E; X524 se selecciona del grupo que consiste de A, T, y S; X530 se selecciona del grupo que consiste de R y K; X533 se selecciona del grupo
30		que consiste de I y L; X534 se selecciona del grupo que consiste de P y H; X535 se selecciona del grupo que consiste de R y Q; X544 se selecciona del grupo que consiste de T y I; X546 se selecciona del grupo que consiste de T, A, y I; X547 se selecciona del grupo que consiste de P y D; X550 se selecciona del grupo que consiste de N y K; X551 se selecciona del grupo que consiste de A y E; X552 se selecciona del grupo que consiste de E, R, y D; X553 se selecciona del grupo que consiste de E, N, y R; X554 se selecciona del grupo que consiste de H y L; X555 se selecciona del grupo que consiste de I y V; X556 se selecciona del grupo que consiste de T y E; X557 se selecciona del grupo que consiste de Q, R, H, y D; X562
35		se selecciona del grupo que consiste de S y P; X573 se selecciona del grupo que consiste de P y T; X574 se selecciona del grupo que consiste de E y D; X575 se selecciona del grupo que consiste de S, A, y R; X576 se selecciona del grupo que consiste de A, E, y V; X577 se selecciona del grupo que consiste de G, E, y D; X579 se selecciona del grupo que consiste de E y S; X580 se selecciona del grupo que consiste de D y N; X583 se selecciona del grupo que consiste de V y A; X588 se selecciona del grupo que consiste de M y I; X591 se selecciona del grupo que consiste de H y Y; X592 se selecciona del grupo que consiste de A y G; X603 se selecciona del grupo que consiste de A y S; X605 se selecciona del grupo que consiste de E y A; X606 se selecciona del grupo que consiste de E, A, Q, G, V, y R; X608 se selecciona del grupo que consiste de A, P, y T; X609 se selecciona del grupo que consiste de I, T, y P; X610 se selecciona del grupo que consiste de D y A; X614 se selecciona del grupo que consiste de V y VVKEAI; X616 se selecciona del grupo que consiste de K y E; X622 se selecciona del grupo que consiste de T, A, y P; and X629 se selecciona del grupo que consiste de R, Q, y H; y X630 se selecciona del grupo que consiste de K y no aminoácido.
40		
45		
50		
55		
60		
65		

En algunas realizaciones, los constructos de administración de la invención pueden formularse como una composición farmacéutica, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un constructo de administración de la invención y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, el constructo de administración consiste de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15. En algunos casos, el constructo de administración consiste de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17. Tales composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración a un sujeto. En algunos casos, se formula una composición farmacéutica para administración oral a un sujeto.

Una composición farmacéutica que comprende un constructo de administración puede administrarse a un sujeto (por ejemplo, un humano) con necesidad de ello para tratar una enfermedad. Las enfermedades que pueden tratarse usando los constructos de administración de esta invención incluyen enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias. En algunos casos, la enfermedad es una lesión de las células epiteliales o un daño de las membranas de las células epiteliales (por ejemplo, en el tubo gastrointestinal). En algunos casos, la enfermedad es hepatitis, obesidad, enfermedad del hígado graso, inflamación del hígado o pancreatitis, enfermedad de Crohn (por ejemplo, enfermedad de Crohn fistulizante), colitis ulcerosa (por ejemplo, de leve a moderada o de moderada a grave), reservoritis, proctitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra huésped, artritis reumatoide o psoriasis.

Métodos de purificación y composiciones

La presente divulgación contempla métodos para obtener los constructos de administración de la invención. Las ventajas de los métodos y composiciones descritos en la presente incluyen mantener una alta pureza y actividad biológica de los polipéptidos o proteínas purificados.

Las ventajas específicas de los métodos divulgados en la presente incluyen: a) alta actividad biológica de los constructos de administración debido al plegamiento correcto usando tampones de plegamiento desarrollados específicamente; b) alta pureza química de los constructos de administración purificados junto con baja toxicidad; c) alto rendimiento de recuperación del material sometido a purificación; d) la reproducibilidad de los resultados permite una producción y un suministro fiables; e) capacidad de fabricación y ampliación a escala a escala de varios gramos y varios kilogramos para aplicaciones clínicas y comerciales; f) el uso sostenible de materiales y recursos proporciona un método de purificación rentable y logísticamente eficaz para moléculas clínicamente relevantes. Además, los métodos de fabricación mejorados pueden aumentar la velocidad a la que pueden desarrollarse estas proteínas purificadas para uso terapéutico (FIG. 22).

En la **FIG. 17** se muestra un proceso ejemplar para la purificación de los constructos de administración descritos en la presente, que ilustra adicionalmente la pureza ejemplar y las cantidades de recuperación para el constructo de administración en cada etapa del proceso de purificación.

Como se usa en la presente, "pureza" indica un nivel de proteína deseada (por ejemplo, constructo de administración) o forma deseada de la proteína (por ejemplo, un monómero del constructo de administración, un constructo de administración plegado corregido o una combinación de los mismos) en una composición que también puede comprender proteínas no deseadas o formas no deseadas de la proteína (por ejemplo, un agregado del constructo de administración, una proteína plegada incorrectamente o una combinación de los mismos). El nivel puede representarse mediante un porcentaje (%) de la proteína deseada o la forma deseada de la proteína. Por ejemplo, la pureza puede ser mayor del 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%, o puede ser del 100%. El término "purificado" puede usarse para indicar una composición que ha experimentado un aumento en la pureza. Un aumento en la pureza puede deberse a los procedimientos de purificación descritos en la presente, como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de intercambio catiónico o una combinación de las mismas.

En algunos casos, los métodos y composiciones de la presente divulgación comprenden el uso de por lo menos dos columnas de cromatografía que se realizan en tándem, seguido de un paso de concentración/intercambio de tampón (ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) para concentrar e intercambio de tampón de la solución). Las columnas de cromatografía pueden ser sistemas de cromatografía de baja presión, como la columna AKTA Avant 150 o una columna AKTA Pilot de General Electric (GE). En algunos casos, por lo menos una columna contiene una resina de intercambio aniónico (por ejemplo, resina NH2-750F) y por lo menos una columna contiene una hidroxipatiteresina (por ejemplo, resina CaPure®). En algunos casos, se usa por lo menos una columna que contiene la resina de intercambio aniónico para el paso de captura, mientras que por lo menos una columna que contiene la resina de hidroxipatita se usa para el paso de pulido. En algunos casos, en lugar de (o además de) la columna de hidroxipatita, puede usarse una columna de intercambio catiónico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la columna de intercambio catiónico con una resina de polimetacrilato funcionalizada con sulfato, como TOYOPEARL Sulfate-650F. La pureza de la proteína solubilizada puede aumentar del 44% al 47% después de la UF/DF a del 93% al 97% después de la cromatografía de intercambio aniónico hasta por lo menos el 99% después de la cromatografía de hidroxipatita. La recuperación de la proteína solubilizada puede aumentar del 70% al 73% tras la cromatografía de intercambio aniónico hasta por lo menos el 97% tras la cromatografía de

hidroxiapatita.

Aislamiento de constructos de administración de cuerpos de inclusión

En algunas realizaciones, los constructos de administración que se van a purificar se aíslan a partir de los cuerpos de inclusión (IB). Los IB, como se describen en la presente, pueden ser agregados nucleares o citoplasmáticos de sustancias estables, como proteínas y polipéptidos. En algunas realizaciones, los cuerpos de inclusión doblemente lavados (DWIB) que comprenden el constructo de administración de la fermentación se resuspenden en un sistema de tampón específico (ver **EJEMPLO 6**).

En algunos casos, la concentración de DWIB es de aproximadamente 0,5 g de DWIB/100 ml de tampón a aproximadamente 5 g de DWIB/10 ml de tampón. En algunos casos, la concentración de DWIB es de aproximadamente 2 g de DWIB/50 ml de tampón a aproximadamente 5 g de DWIB/50 ml de tampón. En algunos casos, la concentración de DWIB es de aproximadamente 1 g de DWIB/20 ml de tampón a aproximadamente 1 g de DWIB/10 ml de tampón. En algunos casos, la concentración de DWIB es de por lo menos 1 g de DWIB/100 ml de tampón. En algunos casos, la concentración de DWIB es de por lo menos 1 g de DWIB/10 ml de tampón.

El sistema tampón para la resuspensión puede comprender una variedad de ingredientes y agentes tampón. En algunos casos, el sistema tampón para la resuspensión comprende guanidina/HCl (Gu-HCl) a una concentración de por lo menos 1 M, por lo menos 2 M, por lo menos 4 M, por lo menos 6 M, por lo menos 8 M. En algunos casos, la concentración de Gu-HCl es de aproximadamente 4 M a aproximadamente 8 M. En algunos casos, el sistema tampón para la resuspensión comprende tampón Tris, en donde la concentración de Tris es de por lo menos 5 mM, por lo menos 10 mM, en por lo menos 20 mM, por lo menos 50 mM o por lo menos 100 mM. En algunos casos, el tampón Tris tiene una concentración de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM. El tampón Tris puede ser Tris-HCl. El Tris-HCl puede tener un pH de 8,0 a 8,5. El Tris-HCl puede tener un pH de 8,2. En algunos casos, el sistema tampón para la resuspensión comprende ditiotretitol (DTT). El DTT puede tener una concentración de por lo menos 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM o 70 mM. El DTT puede tener una concentración de 7 mM a 11 mM, de 8 mM a 10 mM o de 9 mM a 10 mM. En algunos casos, el sistema tampón para la resuspensión comprende ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El EDTA puede tener una concentración de por lo menos 1 mM, 1,5 mM, 2 mM o 2,5 mM. El EDTA puede tener una concentración de 1 mM a 2,5 mM o de 1,9 mM a 2,1 mM. En algunas realizaciones, el sistema tampón para la resuspensión comprende, consiste esencialmente de, o consiste de un tampón Tris, Gu-HCl y DTT. El sistema tampón usado para la resuspensión puede tener un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 10. En algunos casos, el sistema tampón tiene un pH de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5. En algunos casos, el pH del sistema tampón es de por lo menos 7. En algunos casos, el pH del sistema tampón es de por lo menos 8. En algunos casos, el pH del sistema tampón es de por lo menos 8,5.

Reducción de constructos de administración solubilizados

Puede añadirse un agente reductor a la solución de resuspensión. El agente reductor puede ser ditiotretitol (DTT). La cantidad de agente reductor usado puede depender del volumen de la solución de resuspensión y del constructo de administración presente en esa solución. En algunos casos, la cantidad de agente reductor usado es de aproximadamente 0,025 mM a aproximadamente 50 mM, de 0,5 mM a 30 mM, de 1 mM a 10 mM. En algunos casos, la cantidad de agente reductor usado es por lo menos (o entre) 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM o 10 mM.

La solución de constructos de administración solubilizados puede incubarse a varias temperaturas que varían de aproximadamente 2° C a aproximadamente 40° C. En algunos casos, la solución de proteínas puede incubarse a temperatura ambiente (TA). La incubación puede realizarse mientras se agita la solución. La solución puede agitarse en una placa de agitación magnética y luego centrifugarse. La centrifugación puede realizarse a de aproximadamente 1.000 xg a aproximadamente 20.000 xg. En algunos casos, la centrifugación se realiza a 15.970 xg durante 90 minutos a 4° C. El tiempo de incubación puede variar de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 180 minutos, dependiendo de la concentración de los ingredientes, la concentración del constructo de administración.

La concentración de proteína en varias soluciones a lo largo de los métodos y procedimientos como se describe en la presente puede realizarse usando el ensayo de Bradford. La concentración del constructo de administración solubilizado puede ser de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. En algunos casos, la concentración final del constructo de administración solubilizado puede ser de aproximadamente 3 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml. En algunos casos, la concentración final del constructo de administración solubilizado puede ser de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml. En algunos casos, la concentración final del constructo de administración solubilizado puede ser de por lo menos 15 mg/ml.

Repliegue de constructos de administración

Los constructos de administración pueden ejercer su actividad biológica debido a su estructura tridimensional o plegado específicos. Por lo tanto, el repliegado de estos polipéptidos puede ser importante en el desarrollo de estos polipéptidos para aplicaciones farmacéuticas. El repliegado deseable de un constructo de administración de la invención puede comprender el repliegado del portador o la IL-22 en una estructura terciaria similar a una estructura terciaria de un portador homólogo de origen natural o una secuencia de IL-22 o una estructura terciaria que dé como resultado el mantenimiento de la actividad deseada del portador (por ejemplo, transcritosis del constructo de administración) e IL-22. Los métodos descritos en la presente pueden comprender el repliegado del constructo de administración solubilizado para producir un constructo de administración repliegado. El repliegado puede producirse antes de realizar la cromatografía de intercambio aniónica.

Los constructos de administración pueden añadirse a una solución de repliegado, también denominada solución tampón de repliegado. La cantidad de proteína solubilizada usada puede ser de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml, de 1 mg/ml a 100 mg/ml, de 1 mg/ml a 50 mg/ml, de 1 mg/ml a 10 mg/ml, de 5 mg/ml a 20 mg/ml, o de aproximadamente 15 mg/ml. La cantidad de proteína solubilizada puede ser de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mg/ml. La cantidad de proteína solubilizada puede no ser mayor de 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/ml. La solución de repliegado puede tener un pH de entre 7,5 y 8,5, o de aproximadamente 7,0.

La solución tampón de repliegado puede comprender un aminoácido, un poliol, una sal, un azúcar, un reactivo redox, un caotrope o una combinación de los mismos. El aminoácido puede ser prolina, glicina, arginina o alanina. El poliol puede ser glicerol. La sal puede ser cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) o cloruro de magnesio (MgCl₂). El azúcar puede ser glucosa o sacarosa. El reactivo redox puede ser cisteína, cistamina, glutatión, ditiotritol (DTT) o sulfato de cobre (CuSO₄). En algunas realizaciones, el tampón de repliegado comprende Tris-base, Arginina-HCl, urea, EDTA, glicerol, L-cisteína, cistamina-2HCl, DTT, Gu-HCl o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el tampón de repliegado comprende, consiste esencialmente de, o consiste de Tris pH 8,5, arginina, glicerol, cisteína y cistamina. Las concentraciones de tampón Tris pueden variar de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, con un pH que varía de aproximadamente 6 a aproximadamente 9. Las concentraciones de arginina-HCl pueden variar de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 1,5 M, de aproximadamente 0,75 M a aproximadamente 1,25 M, o de aproximadamente 0,75 M a aproximadamente 1,25 M. o aproximadamente 1,0 M. Las concentraciones de urea pueden variar de aproximadamente 0,5 M a 1,5 M. Las concentraciones de EDTA pueden variar de 1 mM a 3 mM. Las concentraciones de glicerol pueden variar de aproximadamente el 2% v/v a aproximadamente el 20% v/v, de aproximadamente el 8% v/v a aproximadamente el 12% v/v o aproximadamente el 10% v/v. Las concentraciones de cisteína pueden ser de 1 mM a 5 mM, de 2 mM a 4 mM, o de aproximadamente 3 mM. La cisteína puede ser L-cisteína. Las concentraciones de cistamina pueden variar de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 5 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 4 mM, o de aproximadamente 3 mM. La cistamina puede ser cistamina-2HCl. Las concentraciones de DTT pueden variar de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM. Las concentraciones de Gu-HCl pueden variar de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM. El tampón de repliegado puede comprender, consistir esencialmente de, o consistir de Tris, L-arginina, urea, EDTA, cisteína y cistamina. El tampón de repliegado puede comprender, consistir esencialmente de o consistir de Tris 100 mM pH 8,5, arginina 1 M, glicerol al 10% (v/v), L-cisteína 3 mM y cistamina-2HCl 1 mM. El constructo de administración solubilizado puede añadirse al tampón de repliegado para producir una mezcla de repliegado. La concentración del constructo de administración, después de la adición a la mezcla de repliegado, puede ser de aproximadamente 0,1 mg/ml a 1,0 mg/ml, de 0,5 mg/ml a 1,5 mg/ml, de 0,75 mg/ml a 1,25 mg/ml, o de aproximadamente 1 mg/ml. La concentración del constructo de administración en la mezcla de repliegado puede ser menor de 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml o 1,0 mg/ml.

En varias realizaciones, se usa un volumen de aproximadamente 100 ml a aproximadamente 10.000 l de tampón de repliegado. En algunos casos, el volumen es de aproximadamente 50 ml a aproximadamente 1500 l. En algunos casos, el volumen es de aproximadamente 10 l a aproximadamente 300 l. En algunos casos, el volumen es de por lo menos 200 l.

La solución de repliegado puede tener una cierta temperatura. Por ejemplo, la solución de repliegado puede preenfriarse a aproximadamente 2-12° C. En algunos casos, la solución de repliegado se enfría previamente a por lo menos aproximadamente 3° C. Este proceso de repliegado puede optimizarse dependiendo de la proteína usada y la aplicación (**FIG. 18**).

En algunas realizaciones de la presente divulgación, la mezcla de repliegado se incuba durante un cierto período de tiempo. En algunos casos, el proceso puede durar aproximadamente una hora, dos horas, cuatro horas, cinco horas o 20 horas. En algunos casos, el proceso de repliegado tarda entre 15 y 25 horas. En algunos casos, una bomba peristáltica se ajusta a un cierto caudal dependiendo de la constitución de la solución (por ejemplo, concentración o volumen) para administrar el material solubilizado en la solución de repliegado. En algunos casos, una bomba peristáltica se ajusta a un caudal de 60-80 ml/min. El proceso de optimización utilizó un diseño de experimentos (DOE) de 15 matrices diferentes, 12 variables y 200 reacciones de repliegado. Las decisiones se

tomaban mediante un proceso de eliminación.

En varias realizaciones, puede realizarse un análisis cuantitativo para determinar la cantidad o el porcentaje de proteína plegada correctamente en la solución que comprende los constructos de administración replegados. En algunos casos, se realiza SEC-HPLC para determinar la cantidad de constructo de administración correctamente plegado presente en las muestras replegadas.

La pureza del constructo de administración replegado puede ser del 45% al 65%, del 40% al 60% o del 45% al 55%. La pureza del constructo de administración replegado puede ser de por lo menos el 40%, 45%, 50% o 55%.

Filtración de flujo tangencial (TFF) de constructos de administración de IL-22 solubilizados

En varias realizaciones, el replegado de proteínas se realiza en combinación con o antes de los sistemas de filtración de flujo tangencial (TFF) (por ejemplo, Millipore) y sistemas de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) con ciertos puntos de corte de peso molecular (MWCO).

La mezcla de replegado de proteínas puede ser procesada posteriormente por TFF para concentrar e intercambiar tampón de la solución. En algunos casos, el proceso se realiza por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). Durante la ultrafiltración, la solución puede concentrarse de 8 a 12 veces, o aproximadamente 10 veces. La ultrafiltración puede ir seguida de un intercambio de tampón de 5 veces durante la diafiltración con un tampón de diafiltración. La UF/DF puede comprender el uso de filtros Millipore Ultracell Pellican3 MWCO de 10-20 kDa, con casetes de láminas planas TFF de 1-2 m². Los parámetros específicos (es decir, TMP) pueden variar dependiendo de las características moleculares de la proteína. El tampón de diafiltración puede comprender Tris-base 10-25 mM a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,5, y NaCl de 50-200 mM. Los parámetros específicos pueden variarse dependiendo de las características moleculares de la proteína. El volumen final al final del proceso de UF/DF puede ser de aproximadamente 5 l a aproximadamente 100 l. En algunos casos, el volumen final varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 l. En algunos casos, el volumen final varía de aproximadamente 80 ml a aproximadamente 10 l.

La filtración posterior puede llevarse a cabo usando un sistema de filtración de flujo. En algunos casos, el sistema de filtración de flujo es un sistema de filtro AkroPac y una bomba peristáltica y tubo Cole-Parmer. Puede realizarse el ensayo de Bradford para determinar la concentración de proteína, el rendimiento y la recuperación del paso.

En varias realizaciones, puede realizarse un análisis cuantitativo para determinar la cantidad o el porcentaje de la proteína plegada correctamente en las soluciones de muestra. En algunos casos, se realiza SEC-HPLC para determinar la cantidad del constructo de administración correctamente plegado presente en las muestras replegadas y de UF/DF.

La pureza de una solución que comprende el constructo de administración replegado después de la UF/DF puede ser del 35% al 55%, del 40% al 50%, del 43% al 47% o de aproximadamente el 45%. La pureza de una solución que comprende el constructo de administración replegado después de la UF/DF puede ser de por lo menos el 35%, 40% o 45%. La recuperación del constructo de administración replegado y solubilizado después de la UF/DF puede ser del 87% al 97%, del 90% al 94%, del 92% al 93% o de aproximadamente el 92,5%. (También pueden usarse otros sistemas de concentración y de intercambio de tampón).

Purificación y recuperación de constructos de administración

Como se ha descrito anteriormente, el uso de dos métodos de cromatografía en tándem, como una cromatografía de intercambio aniónico y una cromatografía de hidroxipatita (o, alternativamente, una cromatografía de intercambio catiónico), puede dar como resultado una mayor pureza y recuperación del constructo de administración, como los constructos de administración de IL-22 descritos en la presente, de la solución. En varias realizaciones de la presente divulgación, las especificaciones cromatográficas (por ejemplo, tipo de columna, resina, caudal, sistemas tampón, gradiente y conductividad) se determinan y optimizan dependiendo de varios parámetros, por ejemplo, la proteína a purificar. Pueden usarse una variedad de columnas de purificación para la purificación de proteínas como se describe en la presente.

Cromatografía de intercambio aniónico

Los métodos descritos en la presente pueden comprender realizar una cromatografía de intercambio aniónico (AEX) en una mezcla que comprende el constructo de administración. La mezcla puede ser una solución que comprenda el constructo de administración replegado. La realización de cromatografía de intercambio aniónico puede producir una primera fracción que comprende el constructo de administración.

Pueden usarse una variedad de resinas en combinación con los métodos y composiciones de la presente

divulgación. En algunos casos, la resina comprende perlas de polimetilacrilato funcionalizadas con amina. En algunos casos, se usa la resina de intercambio aniónico NH₂-750F para la purificación de proteínas. Puede llenarse con la resina una columna con una altura de lecho de por lo menos 15 cm, 20 cm, 25 cm o 30 cm. Una columna con una altura de lecho de 10 a 50 cm puede llenarse con resina de una manera que garantice un volumen de columna que pueda facilitar una capacidad de unión dinámica adecuada (por ejemplo, >20 g/l) para permitir la producción de la cantidad deseada de proteína. En algunos casos, la capacidad de unión dinámica de la columna es de 5 g/l a 100 g/l, de 20 g/l a aproximadamente 50 g/l, de 15 g/l a 30 g/l, o de 20 g/l a 25 g/l.

Los sistemas tampón usados para la elución (por ejemplo, elución en gradiente) en la cromatografía de intercambio aniónico pueden comprender una, dos, tres o cuatro soluciones tampón diferentes (por ejemplo, tampones A a D). En algunas realizaciones, se usan dos tampones en la cromatografía de intercambio aniónico y a las que se hace referencia en la presente como Tampón A y Tampón B. En algunos casos, una solución tampón comprende Tris (por ejemplo, 10-50 mM, pH 7-9), y/ o NaCl (por ejemplo, 0,1-5 M). En algunos casos, la solución tampón comprende además glicerol. En algunas realizaciones, la o las soluciones tampón usadas en la cromatografía de intercambio aniónico, como por ejemplo el Tampón A o el Tampón B, comprende, consiste esencialmente de o consiste de Tris pH 7,5 y NaCl y, opcionalmente, glicerol.

El Tampón A puede comprender Tris de 10 mM a 30 mM, de 15 mM a 25 mM, de 19 mM a 21 mM o aproximadamente 20 mM, pH 7,5. El Tampón A puede comprender de 0,25 M a 0,95 M, de 0,35 M a 0,75 M, de 0,45 M a 0,55 M, aproximadamente 0,5 M, de 0,65 M a 0,75 M o aproximadamente 0,7 M de NaCl. El Tampón B puede comprender de 10 mM a 30 mM, de 15 mM a 25 mM, de 19 mM a 21 mM o aproximadamente 20 mM de Tris pH 7,5. El Tampón B puede comprender de 1 M a 3 M, de 1,5 M a 2,5 M, de 1,9 M a 2,1 M o aproximadamente 2 M de NaCl. El Tampón A puede comprender además del 8% al 12%, del 9% al 11% o aproximadamente el 10% (v/v) de glicerol. El Tampón B puede comprender además del 8% al 12%, del 9% al 11% o aproximadamente el 10% (v/v) de glicerol.

Para la cromatografía de intercambio aniónico de la SEQ ID NO: 15, el Tampón A puede comprender Tris 20 mM pH 7,5 y NaCl 0,5 M y el tampón B puede comprender Tris 20 mM pH 7,5 y NaCl 2,0 M (TABLA 4). Para la cromatografía de intercambio aniónico de la SEQ ID NO: 17, el Tampón A puede comprender Tris 20 mM pH 7,5 y NaCl 0,5 M y el Tampón B puede comprender Tris 20 mM pH 7,5 y NaCl 2,0 M. Para la cromatografía de intercambio aniónico de la SEQ ID NO: 14, el Tampón A puede comprender Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 0,7 M y glicerol al 10% (v/v), y el Tampón B puede comprender Tris 20 mM, pH 7,5, NaCl 2,0 M, y 10% (v/v) de glicerol (TABLA 5).

En algunas realizaciones, se añade un cierto volumen de solución salina a la solución de proteína. En algunos casos, se añade a la solución de proteína una solución de NaCl con una concentración que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 M.

Las soluciones de proteínas pueden cargarse en la columna de tal manera que se pueda observar un caudal específico y un tiempo de residencia de columna específico para garantizar la interacción apropiada de la proteína y la fase sólida (por ejemplo, resina). En algunos casos, el caudal se controla de tal manera que el tiempo de residencia de columna sea de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 6 minutos, o de aproximadamente 5 minutos. El tiempo de residencia de columna puede ser de por lo menos 30 segundos o 1, 2, 3, 4 o 5 minutos. El tiempo de residencia de columna no puede ser mayor de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos. El flujo continuo puede recogerse y analizarse para determinar si hay proteína no unida, lo que se considera una pérdida. Para el análisis y la purificación de proteínas, se determina la absorbancia a aproximadamente 280 nm para la concentración de proteínas y SEC-HPLC para la pureza de proteínas.

En algunas realizaciones, se combina un porcentaje (por ejemplo, 0-100%) o caudal (por ejemplo, 1-10 ml/min) de un primer tampón con un segundo tampón para lograr un caudal final específico (por ejemplo, 1-10 ml/min) del sistema de purificación de columna. Por ejemplo, se realiza un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna (CV) del 0,0-62,5% B (100-37,5% A), seguido de un gradiente escalonado hasta el 100% B (0% A) para 5 CV adicionales para la purificación de proteínas. En algunos casos, puede realizarse un gradiente del 0-75% B (100-25% A) 40 CV, Paso 100% B, 10 CV como gradiente de elución que indica un 91-93% de proteína pura y una recuperación del >90%.

La pureza del constructo de administración en la primera fracción puede ser del 90% al 99% o del 91% al 95%. La pureza del constructo de administración solubilizado en la primera fracción puede ser de por lo menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%. La recuperación del constructo de administración solubilizado en la primera fracción puede ser del 61% al 81%, del 66% al 76% o del 71% al 72%.

Cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de hidroxipatita

Los métodos descritos en la presente pueden comprender además someter la primera fracción obtenida después de la cromatografía de intercambio aniónico a una resina de intercambio catiónico para obtener una segunda fracción que comprende el constructo de administración. La resina de intercambio catiónico puede ser una resina de metacrilato funcionalizada con sulfato. La resina de intercambio catiónico puede ser una resina

TOYOPEARL® Sulfate-650Fresin.

Los métodos descritos en la presente pueden comprender adicional o alternativamente someter la primera fracción obtenida después de la cromatografía de intercambio aniónico a una resina de hidroxiapatita para obtener una segunda fracción que comprende el constructo de administración. La resina de hidroxiapatita puede ser una resina de intercambio catiónico que comprende además una afinidad de calcio. La resina de hidroxiapatita puede comprender fosfato de calcio. La resina de hidroxiapatita puede comprender una fórmula química de: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La resina de hidroxiapatita puede comprender un tamaño de partícula de 30 µm a 50 µm, de 35 µm a 45 µm, o de aproximadamente 39 µm. La resina de hidroxiapatita puede ser la resina CaPure®.

Las ventajas de la resina CaPure® pueden incluir a) tolerancia a la sal, lo que permite la adsorción de proteínas a alta conductividad en soluciones acuosas; b) no se requiere preparación de proteínas antes de la carga; c) resulta en una alta recuperación (>90%); d) alta capacidad de unión (>20 mg/ml de resina); e) aumenta la pureza mediante la eliminación de impurezas de bajo peso molecular (LMW); y f) asegura la depuración de endotoxinas (<1,0 UE/mg).

La resina de intercambio catiónico o resina de hidroxiapatita puede usarse para empaquetar una columna cromatográfica. La columna puede comprender una altura de lecho de 10 cm a 50 cm, o de aproximadamente 20 cm. La columna puede comprender una altura de lecho de por lo menos 10 cm, 15 cm, 20 cm, 25 cm o 30 cm. La columna puede comprender una altura de lecho de no más de 20 cm, 30 cm, 40 cm o 50 cm. En algunos casos, la resina de modo mixto de hidroxiapatita CaPure(R) se usa para empaquetar una columna con una altura de lecho de 10-50 cm, asegurando un volumen de columna que facilita una capacidad de unión dinámica de un máximo de 10-100 g/l para permitir la producción de la cantidad deseada de proteína.

Los sistemas tampón usados para la elución (por ejemplo, elución en gradiente) en la cromatografía de hidroxiapatita pueden comprender una, dos, tres o cuatro soluciones tampón diferentes (por ejemplo, Tampones A a D). En algunas realizaciones, se usan dos tampones en la cromatografía de hidroxiapatita y a los que se hace referencia en la presente como Tampón A y Tampón B. En algunos casos, una solución tampón comprende Tris (por ejemplo, 10-50 mM, pH 7-9), y/o NaCl (por ejemplo, 0,1-5 M). En algunos casos, la solución tampón comprende además glicerol. En algunas realizaciones, una primera solución tampón usada en la cromatografía de hidroxiapatita, como por ejemplo el Tampón A, comprende, consiste esencialmente de, o consiste de Tris pH 7,5, NaCl y CaCl_2 . En algunas realizaciones, una segunda solución tampón usada en la cromatografía de hidroxiapatita, como por ejemplo el Tampón B, comprende, consiste esencialmente de, o consiste de fosfato de sodio pH 7,0, NaCl y CaCl_2 .

El Tampón A puede comprender Tris de 10 mM a 30 mM, de 15 mM a 25 mM, de 19 mM a 21 mM o aproximadamente 20 mM, pH 7,5. El Tampón A puede comprender de 80 mM a 120 mM, de 90 mM a 110 mM o aproximadamente 100 mM de NaCl. El Tampón A puede comprender de 0,5 mM a 1,5 mM, de 0,75 mM a 1,25 mM, de 0,9 mM a 1,1 mM o aproximadamente 1 mM de CaCl_2 . El tampón B puede comprender de 150 mM a 250 mM, de 175 mM a 225 mM, de 190 mM a 210 mM o aproximadamente 200 mM de fosfato de sodio pH 7,0. El Tampón B puede comprender de 50 mM a 150 mM, de 75 mM a 125 mM, de 90 mM a 110 mM o aproximadamente 100 mM de NaCl. El tampón B puede comprender de 0,5 mM a 1,5 mM, de 0,75 mM a 1,25 mM, de 0,9 mM a 1,1 mM o aproximadamente 1 mM de CaCl_2 .

Para la cromatografía de hidroxiapatita de la SEQ ID NO: 15, el Tampón A puede comprender Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y CaCl_2 1 mM y el Tampón B puede comprender fosfato de sodio 200 mM pH 7,0, NaCl 100 mM y CaCl_2 1 mM (**TABLA 6**). Para la cromatografía de hidroxiapatita de la SEQ ID NO: 17, el Tampón A puede comprender Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y CaCl_2 1 mM y el tampón B puede comprender fosfato de sodio 200 mM pH 7,0, NaCl 100 mM y CaCl_2 1 mM. Para la cromatografía de hidroxiapatita de la SEQ ID NO: 14, el Tampón A puede comprender Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y CaCl_2 1 mM y el Tampón B puede comprender fosfato de sodio 200 mM pH 7,0, NaCl 100 mM y CaCl_2 1 mM (**TABLA 7**).

La pureza de la proteína solubilizada tras el uso de resina de intercambio catiónico o resina de hidroxiapatita puede ser del 99% al 100%. La pureza de la proteína solubilizada después del uso de resina de hidroxiapatita puede ser de por lo menos el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%. La recuperación de la proteína solubilizada tras el uso de la resina de hidroxiapatita puede ser del 85% al 100%, del 96% al 99% o del 97% al 98%. La resina de hidroxiapatita puede ser CaPure®.

Las fracciones recogidas durante la cromatografía en columna que contienen el compuesto purificado pueden concentrarse y formularse para su administración usando intercambio de tampón o diafiltración. Por ejemplo, las fracciones recogidas durante CaPure® pueden concentrarse y formularse usando un sistema TFF (por ejemplo, Pall Corporation) para concentrar la proteína. La proteína puede concentrarse hasta una concentración final de 20 mg/ml seguido de un intercambio de tampón de 5 veces. El proceso de filtración puede realizarse usando ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) y filtros con MWCO Millipore Pellican3 de 10 kDa, casetes de láminas planas de TFF de 0,114 m². El MWCO del sistema de filtración puede variar dependiendo de la proteína (por ejemplo, peso molecular) a purificar. El tampón de diafiltración puede consistir de fosfato de sodio 10-20 mM a un pH de

aproximadamente 7,0, NaCl 50-100 mM. Las SEQ ID NO: 14-21 formuladas puede filtrarse posteriormente usando un sistema de filtración de flujo que emplea un filtro AkroPac de 0,8/0,2 μ m y una bomba peristáltica y tubo Cole-Parmer. La proteína purificada y formulada puede almacenarse en alícuotas a -80° C hasta su uso posterior.

En realizaciones específicas, las proteínas analizadas por SEC-HPLC pueden mostrar una pureza superior al 97% (típicamente >98%) usando la columna TSKgel GW3000SWXL, 5 μ m, 7,8 mm ID x 30,0 cm L (Tosoh Bioscience, 8541).

Análisis de proteínas

Las muestras de diferentes fracciones pueden analizarse mediante SDS-PAGE usando el sistema de imagenología Bio-Rad ChemiDoc™ MP, y las fracciones recogidas durante la cromatografía en columna pueden analizarse para determinar el contenido de proteína usando Thermo Fisher Nanodrop One™. Las técnicas generales para la detección o el análisis de proteínas incluyen electroforesis en gel, microscopía de fluorescencia, electroforesis capilar, espectrometría de masas, ensayo de cambio de movilidad electroforético o resonancia magnética nuclear.

Usos terapéuticos

En varias realizaciones de la presente invención, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los constructos de administración de la invención para su uso en el tratamiento y/o prevención de enfermedades inflamatorias. Estas composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración oral. Las "enfermedades inflamatorias" pueden incluir todas las enfermedades asociadas con inflamación aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del organismo a los estímulos nocivos y resulta de un movimiento aumentado de plasma y leucocitos (como, por ejemplo, granulocitos) desde la sangre hacia los tejidos lesionados. Una serie de eventos bioquímicos propagan y maduran la respuesta inflamatoria, implicando al sistema vascular local, el sistema inmunitario y varias células dentro del tejido lesionado. La inflamación prolongada se conoce como inflamación crónica, lo que lleva a un cambio progresivo en el tipo de células presentes en el sitio de la inflamación y se caracteriza por la destrucción y curación simultáneas del tejido del proceso inflamatorio. Las enfermedades inflamatorias pueden ser provocadas, por ejemplo, por quemaduras, irritantes químicos, congelación, toxinas, infecciones por patógenos, lesiones físicas, reacciones inmunitarias debidas a hipersensibilidad, radiación ionizante o cuerpos extraños, como por ejemplo astillas, suciedad y desechos. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria es lesión de células epiteliales, hepatitis, obesidad, enfermedad del hígado graso, inflamación del hígado, pancreatitis, enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn fistulizante, colitis ulcerosa, colitis ulcerosa de leve a moderada, colitis ulcerosa de moderada a grave, reservoritis, proctitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra huésped, artritis reumatoide o psoriasis.

EJEMPLOS

Estos ejemplos se proporcionan únicamente con propósitos ilustrativos y no para limitar el alcance de las reivindicaciones proporcionadas en la presente.

EJEMPLO 1

Expresión de un constructo de administración

En este ejemplo, se describe de manera general la preparación de un constructo de administración como una sola secuencia de aminoácidos que comprende una secuencia portadora derivada de CholiX, una secuencia espaciadora y una carga útil terapéutica.

Primero, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un constructo de administración de la SEQ ID NO: 15 se amplificó mediante PCR, incorporando pares de enzimas de restricción de sitios NdeI y EcoRI, PstI y PstI, AgeI y EcoRI, o PstI y EcoRI en dos extremos de los productos de PCR. Después de la digestión con enzimas de restricción, los productos de PCR se clonaron en un plásmido apropiado para la expresión celular, que se digirió con los pares de enzimas de restricción correspondientes. El plásmido codificó un constructo de administración que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15.

El constructo de administración se expresó de la siguiente manera: se transformaron células competentes de E. coli BL21(DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI) usando un método estándar de choque térmico en presencia del plásmido apropiado para generar células de expresión del constructo de administración, seleccionadas en medios que contienen ampicilina, y se aisló y cultivó en caldo Luria-Bertani (Difco; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) con antibiótico, luego se indujo la expresión de proteínas mediante la adición de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM en OD 0,6. Dos horas después de la inducción con IPTG, las células se recogieron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. Los cuerpos de inclusión se aislaron después de la lisis celular y se lavaron dos veces con agua en una proporción de 1 g/10 ml. El sedimento de la lisis celular se volvió a suspender

con agua seguido de una hora de centrifugación a 10.000 rpm a 4° C. Luego, este lavado se repitió una vez. Los IB doblemente lavados (DWIB) del mismo se solubilizaron en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), HCl de guanidina 6 M y ditiotritol (DTT) 10 mM. Luego, el material solubilizado se diluyó en un tampón de repliegado que contenía Tris 0,1 M (pH = 8,5 a 4° C), L-arginina 1,0 M, glicerol al 10%, L-cisteína 3 mM, cistamina-2HCl 1 mM. La proteína repliegada con la SEQ ID NO: 15 se purificó por cromatografía de intercambio aniónico (intercambio aniónico Q sepharose) y cromatografía de filtración en gel Superdex 200 (Amersham Biosciences, Inc., Suecia). La pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE y HPLC analítica (Agilent, Inc. Palo Alto, California).

Se evaluó el constructo de administración para verificar el plegamiento apropiado con respecto a su tamaño molecular anticipado. Después de la inducción, la proteína expresada se recogió de los cuerpos de inclusión. Usando los cuerpos de inclusión, se verificó el grado de expresión del constructo de administración mediante electroforesis en gel y se comparó el peso molecular aparente con la masa calculada.

Los resultados demostraron una producción estable y eficiente de un constructo de administración funcional con alto rendimiento y pureza.

EJEMPLO 2

Modelo *in vitro* que evalúa el transporte de carga útil a través de monocapas de células epiteliales

Este ejemplo demuestra un modelo *in vitro* diseñado para evaluar las propiedades de transporte de cargas útiles o constructos de administración descritos en la presente.

La **FIG. 1** muestra esquemáticamente una configuración que comprende una cámara apical por encima de la monocapa de células epiteliales y una cámara basal por debajo de dicha monocapa de células epiteliales.

Para la permeabilidad apical a basolateral, se añadieron artículos de prueba (por ejemplo, constructo de administración, carga útil, etc.) al lado apical (A) y se determinó la cantidad de permeación en el lado basolateral (B). Para la permeabilidad basolateral a apical, se añadieron artículos de prueba al lado basolateral (B) y se determinó la cantidad de permeabilidad en el lado apical (A).

Los datos pueden expresarse como permeabilidad (Papp) de acuerdo con la siguiente ecuación: $Papp = (dQ/dt)/(C_0 \cdot A)$. Q/dt es una tasa de permeación, C0 es la concentración inicial del artículo de prueba y A es el área de la monocapa. Puede calcularse una relación de transporte de salida (Re) de acuerdo con la siguiente ecuación: $(Re) = Papp(BA)/Papp(AB)$. $Re > 2$ puede indicar un sustrato potencial para P-gp u otros transportadores de eflujo activos.

Pueden usarse células SMI-100 o Caco-2 para evaluar la función de transcitosis de un portador o un constructo de administración *in vitro*.

Para las células Caco-2, se realizó un ensayo ELISA para evaluar la capacidad de un portador o constructo de administración para moverse a través de las monocapas de células Caco-2 mediante transcitosis. Las células Caco-2 (ATCC HTB-37™) se mantuvieron en CO₂ al 5% a 37° C en medio completo: medio de Eagle modificado por Dulbecco F12 (DMEM F12) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2,5 mM, 100 U de penicilina/ml y 100 ug de estreptomina/ml (Gibco BRL, Grand Island, NY). Las células se alimentaron cada 2 a 3 días con este medio (designado medio completo) y se pasaron cada de 5 a 7 días. Para los ensayos, las células se sembraron en placas de 24 o 96 pocillos y se cultivaron hasta la confluencia.

Las células Caco-2 se cultivaron como monocapas confluentes en soportes transwell de membrana de policarbonato de 0,4-µm de tamaño de poro recubiertos de colágeno (Corning-Costar, Cambridge, MA) y se usaron 18-25 días después de alcanzar una resistencia eléctrica transepitelial (TER) de >250 Ω·cm² medido usando un voltímetro de palillo Millicell-ERS® (Millipore). El transporte de apical a basolateral (A→B) de un portador o constructo de administración a través de esta monocapa se determinó midiendo la cantidad de proteína transportada en ciertos puntos temporales (por ejemplo, 15, 30 y 45 minutos) después de 4,7 nM, 23,6 nM y 236 nM de la aplicación apical de constructo de administración a 37° C. Se usaron mediciones de TER y el grado de dextrano fluorescente de 10 kDa (medido usando un protocolo de exclusión por tamaño de HPLC) para verificar las propiedades de barrera de la monocapa durante el curso del estudio. La extensión del transporte del constructo de administración (por ejemplo, SEQ ID NO: 15) se determinó por titulación de los medios recogidos en el ensayo de citotoxicidad basado en células. El constructo de administración transportado se midió mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpos (por ejemplo, antiportador o anticarga útil, como un anticuerpos anti-IL-22) para la captura y detención.

Se permitió que las monocapas confluentes de tejidos del intestino delgado humano (SMI-100, MatTek Corporation; Ashland, MA, USA) establecidas en insertos de cultivo celular se estabilizaran durante 24 h a 37° C antes de su uso. Se consideró que solo los insertos que tenían una resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de

>400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ tenían suficiente integridad de monocapa para su uso en estudios. Se realizó una verificación secundaria de la integridad de la monocapa evaluando la supresión del transporte de dextrano de 70 kD. Las cámaras se lavaron una vez con tampón de transporte (PBS). Las moléculas de prueba, preparadas a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se aplicaron a la superficie apical de los insertos en volúmenes de 100 μl . Se reemplazaron volúmenes basolaterales de 500 μl de PBS en cada punto temporal para los estudios de transporte. Cada condición experimental se realizó por triplicado.

EJEMPLO 3

Transporte mediado por portadores de IL-22 a través de células epiteliales intestinales polarizadas

Este ejemplo demuestra que un portador (SEQ ID NO: 7) puede transportar una carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) a través de células epiteliales intestinales polarizadas *in vitro*. Este ejemplo demuestra además que el portador con la SEQ ID NO: 7 puede transportar la carga útil de IL-22 biológicamente activa a través de las células epiteliales intestinales polarizadas y a la lamina propia *in vivo*.

El transporte del constructo de administración (SEQ ID NO: 15) a través de monocapas de células Caco-2 y tejido epitelial del intestino delgado (también referido en la presente como SMI-100) se probó aplicando el constructo de administración a la membrana apical de las células epiteliales, de acuerdo con el **EJEMPLO 2** y como se ilustra en la **FIG. 1** para el transporte de apical (A) a basal (B). Los experimentos se realizaron por duplicado y se recogieron muestras de la cámara basolateral a los 15, 30 y 45 minutos después de la aplicación apical para determinar la cantidad de proteína transportada. La cantidad de proteína transcitada se midió usando ensayos ELISA como se describe en el **EJEMPLO 2**.

Los datos en la **FIG. 2** y la **FIG. 3** muestran que un portador (SEQ ID NO: 7) cuando se acopla a IL-22 (SEQ ID NO: 11) dio como resultado el transporte de la carga útil de IL-22 a través de monocapas de Caco-2 (**FIG. 2**) y SMI-100 (**FIG. 3**) de una manera dependiente del tiempo, y que el constructo de administración dio como resultado que cruzase las células epiteliales aproximadamente 2-3 veces más IL-22 en comparación con una IL-22 (SEQ ID NO: 12, M+ IL-22³⁴⁻¹⁷⁹) solo que no estaba acoplado a un portador.

Para los experimentos *in vivo*, se probó la transcitosis usando ratas Wistar macho. Se alojaron 3-5 ratas Wistar macho por jaula con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h y pesaban aproximadamente 225-275 g (aproximadamente 6-8 semanas de edad) cuando se colocaron en el estudio. Los experimentos se realizaron durante la fase de luz usando un protocolo de no recuperación que usa anestesia continua con isoflurano. Se realizó una incisión abdominal de 4-5 cm en la línea media que expuso las regiones del yeyuno medio. Se prepararon soluciones madre a $3,86 \times 10^{-5}$ M de constructo de administración (SEQ ID NO: 15) en solución salina tamponada con fosfato (PBS), administrándose 50 μl (por rata de 250 g) mediante inyección intraluminal (ILI) usando una aguja de calibre 29. Luego, se marcó el mesenterio del lugar de la inyección con un marcador permanente. Al finalizar el estudio, se aisló y procesó para evaluación microscópica una región de 3-5 mm que capturó el segmento de intestino marcado.

Los resultados de la actividad de transcitosis del constructo de administración (SEQ ID NO: 15) se muestran en la **FIG. 4**, demostrando que cantidades significativas de carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) cruzaron un epitelio intestinal intacto y polarizado *in vivo* cuando se proporcionó como parte de un constructo de administración que incluye un portador derivado de cholix (SEQ ID NO: 7) acoplado a IL-22. Esta imagen de microscopía muestra el transporte de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) desde el sitio apical del epitelio intestinal (resaltado por las flechas blancas N° 1) hasta el sitio basal de las células epiteliales (resaltado por la flecha blanca N° 2) y en la *lamina propia* (abreviada como "l.p.") después de la aplicación luminal del constructo de administración de la SEQ ID NO: 15 al yeyuno de ratas Wistar. La imagen muestra además que la IL-22 interactuó y se unió en gran medida a los receptores de IL-22 localizados en las células dentro de la *lamina propia* y en la membrana basal externa del epitelio polarizado (resaltado por las flechas blancas N° 3). La localización de IL-22 está indicada por las flechas blancas N°2 y N°3.

EJEMPLO 4

La IL-22 humana recombinante se une a los receptores murinos de IL-22

Este ejemplo demuestra que la IL-22 humana recombinante (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) se une a los receptores de IL-22 murinos de una manera dependiente de la dosis comparable a la IL-22 murina recombinante (rmIL-22).

La **FIG. 5A** demuestra la fosforilación de STAT3 en células B FL83 murinas en función de la concentración de agonista (en pM), en donde el agonista es rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) o rmIL-22. Los datos muestran que rhIL-22 y rmIL-22 indujeron la fosforilación de STAT3 de manera dependiente de la concentración, lo que demuestra que la proteína IL-22 humana puede unirse e inducir la transducción de señales a través de los receptores de IL-22 de

ratón con tanta eficacia como la IL-22 de ratón.

La **FIG. 5B** demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 también indujeron la fosforilación de STAT3 en células murinas Hepa1-6.

La **FIG. 6A** demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 indujeron la fosforilación de STAT5 en células B FL83 murinas de una manera dependiente de la dosis, lo que demuestra que la proteína IL-22 humana puede unirse e inducir la transducción de señales a través de receptores de IL-22 de ratón con una eficacia comparable a la de la IL-22 de ratón.

La **FIG. 6B** demuestra que rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y rmIL-22 también indujeron la fosforilación de STAT5 en células murinas Hepa1-6 pero será necesario realizar un intervalo de dosis adicional en los experimentos de seguimiento.

Estos datos proporcionan una fuerte evidencia de que rhIL-22 (por ejemplo, como se usa en los constructos de administración con las SEQ ID NO: 10 u 11) es capaz de activar STAT3 y STAT5 en células murinas, proporcionando por tanto una justificación para usar tales constructos de administración en modelos murinos para evaluar la actividad y función de IL-22.

EJEMPLO 5

Eficacia *in vivo* del constructo de administración con la SEQ ID NO: 15 en el modelo de colitis

Este ejemplo demuestra la eficacia *in vivo* del constructo de administración con SEQ ID NO: 15 que comprende el portador derivado de Cholix de la SEQ ID NO: 7 acoplado a una IL-22 con SEQ ID NO: 11 a través de un conector con SEQ ID NO: 13 en comparación a IL-22 sola (SEQ ID NO: 12) en un modelo de ratón de dextrano sulfato de sodio (DSS).

La **FIG. 7A** muestra una descripción general de un diseño de estudio *in vivo* y un cronograma para comparar la administración peroral (p.o.) del constructo de administración de la SEQ ID NO: 15 a dos niveles de dosis una vez al día, 1 mg/kg y 30 mg/kg, y administración una vez al día (intraperitoneal (i.p.)) de rhIL-22 a 4 mg/kg. El estudio *in vivo* se realizó en ratones C57BL/6 hembra alimentados con comida normal, de 8 a 10 semanas de edad, ~23 g. La colitis se indujo químicamente con dextrano sulfato de sodio (DSS) al 2,5% en agua para beber, *ad libitum*. Los criterios de valoración del estudio incluyeron el cambio porcentual en el peso corporal, el índice de actividad de la enfermedad, la longitud y el peso del colon y la histopatología.

La **FIG. 7B** muestra las características de los grupos experimentales y de control usados en el estudio descrito en la **FIG. 7A**.

La **FIG. 8A** muestra el porcentaje (%) de cambio en el peso corporal de los animales en el día 10 del estudio con respecto al día 0 de los varios grupos experimentales y de control. El cambio de peso corporal inicial (día 0 frente a 10) por rhIL-22 con SEQ ID NO: 12 o el constructo de administración con SEQ ID NO: 15 con respecto al vehículo no fue significativo según se evaluó por ANOVA de 1 vía. El control de modelo positivo (ciclosporina) CsA fue significativamente diferente con respecto al vehículo según se evaluó mediante un ANOVA de 1 vía.

La **FIG. 8B** muestra el cambio en el peso corporal de los animales experimentales y de control durante los primeros 10 días de estudio. El peso corporal medio del grupo CsA durante el periodo de estudio mejoró significativamente con respecto al control de vehículo del día 6 al día 10 según se evaluó mediante ANOVA de 2 vías (*, **, ***) rhIL-22 (i.p.) el peso corporal mejoró significativamente con respecto al control de vehículo en el día 10 según se evaluó por ANOVA de 2 vías (*), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

La **FIG. 9** muestra los resultados de los experimentos ELISA en plasma para determinar los niveles en plasma de IL-22. Los resultados muestran que las concentraciones en plasma de rhIL-22 tendieron a aumentar los niveles en plasma después de la administración forzada oral de dosis de 1 y 30 mg/kg del constructo de administración con SEQ ID NO: 15 de manera dependiente de la dosis (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, Media + SEM, n = 2 No tratado, 5 Vehículo, 5 CsA, 10 otros).

Estos datos muestran que el constructo de administración con SEQ ID NO: 15 indujo una tendencia dependiente de la dosis hacia la mejora del peso corporal después de la administración por administración forzada oral. La IL-22 se midió en niveles aumentados en plasma después de la administración forzada oral de dosis de 1 y 30 mg/kg del constructo de administración con SEQ ID NO: 15 de una manera dependiente de la dosis. Estos datos sugieren que el constructo de administración administrado por vía oral con SEQ ID NO: 15 es capaz de reducir los síntomas de colitis en un modelo de ratón DSS comparable a la rhIL-22 administrada i.p.

Además, se evaluaron biomarcadores para el constructo de administración administrable por vía oral con

SEQ ID NO: 15 mediante la administración de rhIL-22 a ratones CD-1 como se describe a continuación.

La **FIG. 10A** muestra una descripción general de un estudio *in vivo* de dosis individual diseñado para identificar biomarcadores de acoplamiento al objetivo después de una dosis individual (dosis aguda) de rhIL-22 en ratones sanos CD-1.

La **FIG. 10B** muestra una descripción general de un estudio *in vivo* de dosis múltiples (dosificación subcrónica) diseñado para identificar biomarcadores de acoplamiento al objetivo después de dosis individuales y múltiples de rhIL-22 en ratones sanos CD-1.

La **FIG. 11A** muestra que la administración aguda y subcrónica de rhIL-22 aumenta la concentración de IL-22 consistentemente.

La **FIG. 11B** muestra algunos parámetros farmacocinéticos medidos durante los experimentos de dosificación aguda y subcrónica descritos en la **FIG. 11A**.

La **FIG. 12A** muestra la concentración de proteína C reactiva murina (mCRP) circulante inducida en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Los resultados muestran un aumento dependiente del tiempo en la mCRP circulante en ambos grupos de estudio.

La **FIG. 12B** muestra el cambio de veces de la concentración de mCRP en plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 12C** muestra el cambio de veces de la concentración de mCRP en plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 13A** muestra la concentración de proteína A amiloide en suero murina (mSAA) circulante inducida en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12). Los resultados muestran un aumento dependiente del tiempo en la mSAA circulante en ambos grupos de estudio, con concentraciones en plasma máximas aproximadas aproximadamente 8 horas después de la administración.

La **FIG. 13B** muestra el cambio de veces de la concentración de mSAA en plasma 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 13C** muestra el cambio de veces de la concentración de mSAA en plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 14A** muestra la proteína $3\beta\beta$ (derivada de los islotes regeneradores Reg $3\beta\beta$) circulante inducida en respuesta a 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12) y después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 14B** muestra el cambio de veces de la concentración en plasma de Reg $3\beta\beta$ 1 día después de la dosificación aguda de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

La **FIG. 14C** muestra el cambio de veces de la concentración de Reg $3\beta\beta$ en plasma después de 5 días de dosificación subcrónica de rhIL-22 (SEQ ID NO: 12).

Estos resultados demuestran que tres biomarcadores potenciales de IL-22 PD de acoplamiento al objetivo: proteína C reactiva (CRP), proteína amiloide en suero A (SAA) y proteína $3\beta\beta$ derivada de islotes regeneradores (Reg $3\beta\beta$) que pueden usarse en estudios que evalúan la farmacodinámica (PD) de constructos de administración como aquellos con las SEQ ID NO: 15 o 17.

EJEMPLO 6

Solubilización de proteínas

Se volvieron a suspender 627 g de cuerpos de inclusión lavados dos veces (DWIB) de la fermentación de la SEQ ID NO: 15 en 4500 ml de guanidina/HCl 8 M (Gu-HCl) y Tris 50 mM, pH 8,0. Posteriormente, se añadió Tris 50 mM pH 8,5 hasta completar el volumen a 6,0 l. La solución se agitó suavemente en una placa de agitación y se añadieron 9,225 g del agente reductor de ditiotretol (DTT). La solución de proteína solubilizada final (SEQ ID NO: 15) de 6 l consistía de Gu-HCl 6 M, Tris 50 mM pH 8,0, DTT 10 mM y ~1 g de DWIB/10 ml de tampón. La solución de proteína solubilizada (SEQ ID NO: 15) se incubó a temperatura ambiente (Ta) mientras se agitaba en una placa de agitación magnética y luego se centrifugó a 15970 x g durante 90 minutos a 4° C. El sobrenadante que

comprende la proteína solubilizada se transfirió cuidadosamente a un nuevo recipiente con un volumen total de 5520 ml. La determinación de la concentración de proteína se realizó mediante el ensayo de Bradford y se determinó a 15 mg/ml.

Los datos demuestran que la solubilización de proteínas se puede realizar usando el procedimiento anterior.

EJEMPLO 7

Replegado de proteínas

Este ejemplo demuestra el replegado de proteínas como parte del proceso de purificación como se describe en el diagrama de flujo de **FIG. 17**.

Se investigó, desarrolló y optimizó cuidadosamente una solución de replegado (**FIG. 18**). El proceso de optimización utilizó un diseño de experimentos (DOE) de 15 matrices diferentes, 12 variables y 200 reacciones de replegado. Las decisiones se tomaban mediante un proceso de eliminación. La mezcla de replegado inicial (que contiene la solución de replegado inicial y la proteína solubilizada replegada (SEQ ID NO: 15)) se presenta en la **TABLA 2**. Una mezcla de replegado optimizada (que contiene la solución de replegado optimizada y la proteína solubilizada replegada (SEQ ID NO: 15)) se presenta en la **TABLA 3**.

TABLA 2 - Mezcla de replegado inicial

Tris 100 mM pH 8,5 (@ 4° C)
arginina 0,5 M
urea 1 M
EDTA 2 mM
GSH 0,3 mM
GSSG 1 mM
Concentración replegada de 0,2 mg/ml

TABLA 3 - Mezcla de replegado optimizada

Tris 100 mM pH 8,5 (@ 4° C)
arginina 1.0 M
glicerol al 10%
L-cisteína 3 mM
cistamina-2HCl 1 mM
>0,1 mg/ml de concentración replegada

La solución de replegado de 105 l se incubó a 4° C durante 16 horas y luego se filtró a través de un filtro de flujo (AkroPac de Pall Corporation o Sartopore 2XLG de Sartorius) usando una membrana de 0,8/0,2 um y una bomba peristáltica y tubo Cole-Parmer.

La proteína solubilizada (SEQ ID NO: 15) (105 g) del **EJEMPLO 6** se añadió a 100 l de una solución de replegado optimizada enfriada previamente a 4° C.

Este proceso se programó a una hora usando una bomba peristáltica Cole-Parmer ajustada a 73 ml/min. Este proceso se llevó a cabo en una cámara frigorífica a 4° C.

La solución tampón de replegado optimizada produjo una mayor cantidad de la SEQ ID NO: 15 con respecto a los agregados de la SEQ ID NO: 15 (**FIGS. 19-20**). El uso de la solución de replegado inicial produjo aproximadamente el 10%-15% de la SEQ ID NO: 15 replegada correctamente. El uso de la solución de replegado optimizado produjo aproximadamente el 45%-55% de la SEQ ID NO: 15 replegada correctamente.

EJEMPLO 8

Concentración de proteínas e intercambio de tampón por TFF UF/DF

Este ejemplo demuestra la concentración de proteínas y el intercambio de tampón usando filtración de flujo tangencial (TFF) basada en principios de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF).

La proteína replegada (por ejemplo, de la SEQ ID NO: 15) se procesó mediante el sistema TFF (Millipore) para concentrarla 10 veces y cambiar el tampón 5 veces. El proceso se realizó por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF)

usando cuatro casetes de lámina plana de TFF de 1,14 m² MWCO Millipore Ultracell Pellican3 de 10 kDa. El tampón de diafiltración consistía en Tris-base 20 mM pH 7,5 y NaCl 100 mM. El volumen final al final del proceso de UF/DF fue de 10 l. Este material se filtró posteriormente usando un sistema de filtración de flujo empleando un filtro AkroPac de 0,8/0,2 µm de Pall Corporation y una bomba peristáltica y tubo Cole-Parmer. Se realizó el ensayo de Bradford para determinar la concentración de proteína, el rendimiento y el paso de recuperación. En este punto, se realizó una SEC-HPLC cuantitativa para determinar la cantidad de proteína correctamente plegada con SEQ ID NO: 15 presente en las muestras replegadas y de UF/DF. Se usó un BSA comercialmente disponible de una concentración conocida como estándar de referencia a partir del cual se generó la curva estándar para el ensayo de Bradford. Se usaron el sistema HPLC Agilent 1100 y columnas TSKgel SuperSW3000, 4 µm, 4,6 mm DI x 30,0 cm L (Tosoh Bioscience, 18675). En base a este ensayo cuantitativo, se determinó la eficiencia de replegado.

Los datos muestran que el replegado de proteínas puede realizarse mediante intercambio de tampón y TFF UF/DF.

EJEMPLO 9

Cromatografía de proteínas con la resina NH₂-750F® de pasos de captura

Este ejemplo demuestra los pasos de captura en la cromatografía de intercambio aniónico de proteínas usando la resina NH₂-750F®.

Para la cromatografía de proteínas se usaron los sistemas de FPLC AKTA Avant 150 o AKTA Pilot de General Electric (GE). Se usó la resina de intercambio aniónico Tosoh NH₂-750F® para empaquetar una columna con una altura de lecho mínima de por lo menos 20 cm y asegurando un volumen de columna que facilitaría una capacidad de unión dinámica de 20-25 g/l. Se usó un tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 4,5 o citrato de sodio 20 mM, pH 4,5 para empaquetar la columna. Los tampones usados fueron los siguientes: tampón A: Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M; tampón B: Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 2,0 M. Luego, la columna NH₂-750F se limpió con una solución de NaOH 0,5 M con un tiempo de contacto de 30 minutos y luego se equilibró con el tampón A durante por lo menos 3 volúmenes de columna (CV), o hasta que el pH y la conductividad alcanzaron líneas estables en los valores esperados (pH 7,5-pH 7,7, ~49 mS/cm +/- 1 mS/cm).

Antes de cargarla en la columna, la solución de proteína UF/DF (SEQ ID NO: 15) se suplementó con NaCl 0,4 M añadiendo una solución madre 5 M y se midió la conductividad para garantizar una conductividad de 49 mS/cm +/- 2 mS/cm. La solución de proteína (SEQ ID NO: 15) se cargó en la columna con un caudal de un mínimo de 5 minutos de tiempo de residencia en la columna y se recogió el flujo continuo. La columna se lavó con 3 CV de tampón A o hasta que la absorbancia volvió a 280 nm y se mantuvo estable en el valor de referencia, cerca de 0,0 mAU a 280 nm. En este punto, se realizó un gradiente lineal de 20 CV del 0,0-62,5% de B, seguido de un gradiente escalonado hasta el 100% de B para 5 CV adicionales. Las fracciones se recogieron en todo momento y sus volúmenes no eran mayores de 0,5 del volumen de la columna. Las muestras de diferentes fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE usando el sistema de imagenología Bio-Rad ChemiDoc™ MP, y las fracciones que contenían más del 90% de la SEQ ID NO: 15 se agruparon y designaron como grupo NH₂-750F. La concentración de proteína del grupo NH₂-750F se midió usando Thermo Fisher Nanodrop One™, leyendo la absorbancia a 280 nm (A280) considerando un coeficiente de extinción de 1,22 para la SEQ ID NO: 15 y una relación 260/280 nm <0,6. El grupo NH₂-750F contiene aproximadamente 1,0 M de NaCl.

En la **FIG. 21A** se muestra un cromatograma de ejemplo después de la purificación con NH₂-750F de la SEQ ID NO: 15 para una altura de lecho de 20 cm y un volumen de columna de 10 ml y en la **FIG. 21B** para una altura de lecho de 30 cm y un volumen de columna de 4,6L.

En la **TABLA 4** se muestra un resumen de la purificación de NH₂-750F para la SEQ ID NO: 15 y en la **TABLA 5** para la SEQ ID NO: 14, que generalmente se produjo, replegó y purificó de manera análoga a la SEQ ID NO: 15.

TABLA 4-Resumen de la purificación de SEQ ID NO: 15 NH₂-750F

SEQ ID NO: 15	
Tampón A	Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M
Tampón B	Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 2,0 M
Altura del lecho	Mínimo 20cm
Tiempo de residencia	5,0 minutos
Gradiente	0,0-62,5% de B, 20CV
Capacidad de unión	20-25 g/L (Ruptura a 40 g/l)
Pureza	93-96%
Recuperación	71-76%
Endotoxina	< 1,0 UE/mg

TABLA 5 - Resumen de la purificación de SEQ ID NO: 14 NH2-750F

SEQ ID NO: 14	
Tampón A	Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 0,7 M, glicerol al 10%
Tampón B	Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 2,0 M, glicerol al 10%
Altura del lecho	Mínimo 20cm
Tiempo de residencia	5,0 minutos
Gradiente	0,0-62,5% B, 20CV
Capacidad de unión	20-25g/l
Pureza	≥93-96%
Recuperación	80-93%
Endotoxina	< 1,0 UE/mg

EJEMPLO 10**Cromatografía de proteínas usando el procedimiento CaPure®**

Este ejemplo demuestra un paso de purificación de pulido en la cromatografía de proteínas usando el procedimiento CaPure®.

Para la cromatografía de proteínas de la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 14 se usaron los sistemas de FPLC AKTA Avant 150 o AKTA Pilot de General Electric (GE). Se usó la resina de modo mixto de hidroxiapatita Tosoh CaPure® para empaquetar una columna para cada una de la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 14 con una altura de lecho mínimo de por lo menos 10 cm y asegurando un volumen de columna que facilitaría una capacidad de unión dinámica de un máximo de 20 g/l. Los tampones usados fueron los siguientes para la SEQ ID NO: 15: tampón A: Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1 mM; tampón B: fosfato sódico 200 mM pH 7,0, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1 mM. Para la SEQ ID NO: 14 los tampones usados fueron los siguientes: tampón A: Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1 mM; tampón B: fosfato sódico 200 mM pH 7,0, NaCl 100 mM y CaCl₂ 1 mM. Luego cada columna CaPure® se limpió con 0,5 M de NaOH con un tiempo de contacto de 30 minutos o más, y luego se equilibró con el tampón A durante por lo menos 3 volúmenes de columna (CV), o hasta que el pH y la conductividad alcanzaron líneas estables en los valores esperados (pH 7,5- pH 7,7, ~11 mS/cm +/- 1 mS/cm). No hubo necesidad de tratar el grupo NH2-750F antes de cargarlo en la columna. Esto redujo significativamente la pérdida de proteínas, el tiempo y los recursos. El grupo NH2-750F se cargó en la columna con un caudal de un mínimo de 5 minutos de tiempo de residencia en la columna y se recogió el flujo continuo. La columna se lavó con 3 CV de tampón A o hasta que la absorbancia volvió a 280 nm y se mantuvo estable en el valor de referencia, cerca de 0,0 mAu. En este punto, se realizó un gradiente lineal de 25 CV del 0-25% de B, seguido de un gradiente escalonado al 100% de B para 5 CV adicionales. Las fracciones se recogieron en todo momento y sus volúmenes variaron entre 0,36 y 1,43 del volumen de la columna, dependiendo del perfil de elución. Se analizaron las muestras de diferentes fracciones mediante SDS-PAGE usando el sistema de imagenología ChemiDoc™ MP, y las fracciones que contenían más del 95% de la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 14 se agruparon y designaron como grupo CaPure. La concentración de proteína del grupo CaPure se midió usando Thermo Fisher Nanodrop One™, leyendo la absorbancia a 280 nm (A280) considerando un coeficiente de extinción de 1,22 para la SEQ ID NO: 15 y una relación 260/280 nm <0,6.

En la **FIG. 22A** se muestra un cromatograma de ejemplo después de la purificación con CaPure® de la SEQ ID NO: 15 para una altura de lecho de 10 cm y un volumen de columna de 5 ml y en la **FIG. 22B** para una altura de lecho de 21 cm y un volumen de columna de 800 ml.

En la **TABLA 6** se muestra un resumen de la purificación por CaPure® para la SEQ ID NO: 15 y en la **TABLA 7** para la SEQ ID NO: 14.

TABLA 6 - Resumen de la Purificación por CaPure® de la SEQ ID NO: 15

SEQ ID NO: 15	
Tampón A	Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, CaCl ₂ 1 mM
Tampón B	Fosfato de sodio 200 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl ₂ 1 mM
Altura del lecho	20 cm
Tiempo de residencia	5,0 minutos
Gradiente	0.0-25% B, 25 CV
Capacidad de unión	20g/l
Pureza	>98%
Recuperación	>92%
Endotoxina	< 1,0 UE/mg

TABLA 7 - Resumen de la Purificación por CaPure® de la SEQ ID NO: 14

SEQ ID NO: 14	
Tampón A	Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, CaCl ₂ 1 mM
Tampón B	Fosfato de sodio 200 mM pH 7,0, NaCl 100 mM, CaCl ₂ 1 mM
Altura del lecho	20 cm
Tiempo de residencia	5,0 minutos
Gradiente	0.0-25% B, 25 CV
Capacidad de unión	20g/l
Pureza	>98%
Recuperación	>92%
Endotoxina	< 1,0 UE/mg

EJEMPLO 11**Concentración de proteínas por TFF UF/DF**

Este ejemplo demuestra la formulación de proteínas mediante procedimientos de TFF UF/DF.

El grupo CaPure® se concentró mediante un sistema TFF (Pall Corporation) hasta una concentración final de 20 mg/ml, seguido de un intercambio de tampón de 5 veces. El proceso se realizó por ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) utilizando tres casetes de lámina plana de TFF de 0,114 m² MWCO Millipore Pellican3 de 10 kDa,. El tampón de diafiltración consistía de fosfato sódico 10 mM pH 7,0, NaCl 100 mM. La SEQ ID NO: 15 formulada se filtró posteriormente usando un sistema de filtración de flujo que empleaba un filtro AkroPac de 0,8/0,2 µm de Pall Corporation y bomba peristáltica y tubo Cole-Parmer. Luego la SEQ ID NO: 15 formulada se almacenó en alícuotas a -80° C y se realizaron los análisis posteriores para garantizar su calidad biofísica: (1) Concentración de proteína (por ejemplo, SEQ ID NO: 15) a 20 mg/ml midiendo la absorbancia a 280 nm con una relación 260/280 <0,6 usando Thermo Fisher Nanodrop One™ y considerando un coeficiente de extinción de proteínas de 1,22; (2) niveles de endotoxina LAL por debajo de 1,0 Eu/mg medidos por el equipo de Charles River Laboratories; (3) Pureza por SEC-HPLC por encima del 97% de pureza (típicamente >98%) usando la columna TSKgel GW3000SWXL, 5 µm, 7,8 mm DI × 30,0 cm L (Tosoh Bioscience, 8541) (4) análisis de SDS-PAGE usando el gel Bio-Rad aparato y su sistema de imagenología ChemiDoc™ MP asociado.

EJEMPLO 12**Evaluación de la actividad *in vivo* de moléculas de fusión purificadas**

Este ejemplo demuestra métodos para verificar el plegamiento apropiado de las moléculas de fusión con respecto a su capacidad para transportar una carga biológicamente activa a través de un epitelio intacto.

La proteína de fusión con SEQ ID NO: 15 se expresa por *E. coli* y se recoge de los cuerpos de inclusión y se pliega usando un sistema de tampón de intercambio aleatorio como se describe en el **EJEMPLO 8** anterior. El material resultante se purifica de acuerdo con los métodos descritos en el **EJEMPLO 9** y el **EJEMPLO 10**, y como se resume, por ejemplo, en las **TABLAS 4-7**, dependiendo de las características moleculares de la molécula de fusión. La preparación tiene una pureza de proteína del ~98% en base a SDS PAGE. Las células epiteliales se tratan con la molécula de fusión que tiene la SEQ ID NO: 15 a concentraciones de 25 nM y 250 nM. En comparación con las células emparejadas no tratadas, las células tratadas con la SEQ ID NO: 15 producen una disminución dependiente de la dosis en el número de células según se evaluó por citometría de flujo de células vivas/muertas). Los valores representan n = 4 ± desviación estándar.

EJEMPLO 13**Aumento a escala de la purificación de proteínas de fusión**

Este ejemplo demuestra un aumento de escala de un método de purificación usando la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 15 (**FIGS. 7A y 7B**).

La proteína de fusión con la SEQ ID NO: 15 se purificó en dos escalas diferentes.

La primera purificación se realizó usando una columna de cromatografía con un volumen de 10 ml empaquetada con resina NH₂-750F® y los siguientes parámetros: Altura del lecho: 20 cm, Tiempo de residencia: 5 min (caudal: 2 ml/min), tampón A: Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, tampón B: Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 2 M, y usando el siguiente gradiente: 0,0-62,5% de B para 20 volúmenes de columna (CV). La proteína de fusión con la SEQ ID NO: 15 se obtuvo con una pureza de 93-96%, una recuperación de >71% y niveles de endotoxina

<1,0 UE/mg.

La segunda purificación se llevó a cabo usando una columna de cromatografía con un volumen de 4,6 l empaquetada con resina NH₂-750F® y los siguientes parámetros: Altura del lecho: 30 cm, Tiempo de residencia: 11,55 min (caudal: 400 ml/min), tampón A: Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, tampón B: Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 2 M, y usando el siguiente gradiente: 0,0-62,5% de B para 20 volúmenes de columna (CV). La proteína de fusión con la SEQ ID NO: 15 se obtuvo con una pureza del 93-96%, una recuperación de >71% y niveles de endotoxina <1,0 EU/mg.

EJEMPLO 14

Consistencia entre las recuperaciones de los pasos del proceso

El proceso de purificación se llevó a cabo para purificar la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 15 cuatro veces (lotes 1-4), y se evaluó la recuperación de esta proteína de fusión después de cada etapa del proceso de purificación (**TABLA 8**). Hubo un alto grado de consistencia en la recuperación de la proteína de fusión entre estas réplicas.

TABLA 8. Recuperación de la proteína de fusión de la SEQ ID NO: 15 en 4 procesos de purificación replicados

Paso de proceso	Descripción del proceso	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Media (%)
2	Replegar UF/DF	98,60%	94%	92,40%	85%	92
3	NH ₂ -750F	68,60%	66,30%	76%	74,50%	71,35%
4	CaPure	99%	96,40%	100%	94,80%	97,55
5	Formulación UF/DF	97,80%	100%	98,75%	100%	99,14

Estos datos demuestran que los métodos y composiciones de la presente divulgación permitieron la producción y purificación de proteína de fusión terapéutica a gran escala, y que los métodos y composiciones divulgados en la presente proporcionaron una alta consistencia durante el aumento de escala.

EJEMPLO 15

Comparación de la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 17

Se realizó cromatografía líquida-espectrofotometría de masas (LC-MS) en composiciones purificadas que representan la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 17, y los resultados se representan en la **FIG. 23B** y la **FIG. 23A**, respectivamente. La composición de la SEQ ID NO: 17 se produjo, replegó y purificó de manera análoga a la descrita anteriormente en relación con la composición de la SEQ ID NO: 15.

EJEMPLO 16

Evaluación in vivo de constructos de administración

Este ejemplo describe una evaluación in vivo de un constructo de administración que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 15 en comparación con el portador.

La **FIG. 24** muestra una descripción general del estudio (dosis individual) para evaluar el transporte del constructo de administración que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 15 a través del epitelio intestinal y hacia la circulación después de la administración oral (abreviada en la presente como P.O.) del constructo. Los animales usados en estos experimentos fueron ratones macho CD-1 sin ayuno. Un criterio de valoración principal del estudio fue la exposición plasmática total a IL-22, y un criterio de valoración secundario fueron los biomarcadores plasmáticos, incluida la proteína de unión a IL-22 (por ejemplo, IL-22BP).

TABLA 9 proporciona detalles referentes a la configuración experimental, incluyendo información referente al constructo de administración líquido (no formulado) y el portador. **TABLA 9 - Configuración experimental del estudio in vivo**

Grupo	Artículo de prueba	Portador	Formulación	Dosis (mpk)	Vía	N (4/dos TP)	Puntos temporales (horas)
1	Portador	PBS, pH 7	Bolo ac.	n/a	P.O.	4	1
2	SEQ ID NO: 15 (líquida)	PBS, pH 7	Bolo ac.	90	P.O.	8 (4* 2)	1,2,4,6

La **TABLA 10** resume las propiedades del constructo de SEQ ID NO: 15 tal como se administra en este experimento.

TABLA 10 - Propiedades del constructo de administración tal como se administra en forma líquida

Grupos	Grupos	Cmax (pg/ml)	Tmax (hr)	AUC (0-6 horas)
SEQ ID NO: 15-Líquido	n/a	24488	2	58126

La exposición plasmática total a IL-22 se midió en los puntos temporales respectivos que se muestran en la **TABLA 9**. La **FIG. 25A** muestra la exposición sistémica total a IL-22 (en pg/ml) y la **FIG. 25B** muestra la exposición a IL-22BP (en pg/ml) en los varios puntos temporales en los que se tomaron las muestras de sangre y las mediciones. Las **FIG. 26A-FIG. 26B** muestran mediciones individuales y puntos de datos para cada grupo probado en este estudio.

Se observó que el constructo de administración administrado por vía oral que tenía la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 15 proporcionaba IL-22 en el plasma.

EJEMPLO 17

La longitud del espaciador y el acoplamiento de la carga útil al extremo N o C de un transportador no afectan significativamente la actividad biológica de la carga útil

Este ejemplo muestra que los conectores de aminoácidos de varias longitudes y el acoplamiento de una carga útil heteróloga al extremo N-terminal de un portador no afecta significativamente a la capacidad de la carga útil de unirse a su objetivo cuando se incluye en un constructo de administración. Los conectores de aminoácidos examinados fueron la SEQ ID NO: 13 (GGGGSGGGSGGGGS), la SEQ ID NO: 28 (GGGGS) y la SEQ ID NO: 31 (GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS).

El ensayo de dimerización del receptor de IL-22 se realizó sembrando células DiscoverX HEK293 e incubando las células durante 16 h (5.000 células por pocillo) usando las concentraciones mostradas de agonista (constructo de administración que contiene la carga útil de IL-22). La luminiscencia del criterio de valoración se leyó en un lector de placas usando el ensayo de dimerización PathHunter® eXpress IL22RA1/IL10RB.

La **FIG. 27A** muestra que la longitud de los espaciadores de aminoácidos con las SEQ ID NO: 13, 28 y 31 no afectó a la capacidad de IL-22 (SEQ ID NO: 11) cuando se incluyeron en los constructos de administración con las SEQ ID NO: 15, 32, y 33 para inducir la dimerización del receptor de IL-22. La inducción de la dimerización del receptor de la IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) se muestra mediante la curva negra.

La **FIG. 27B** muestra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) al extremo N- o C-terminal de un portador que comprende los residuos de aminoácidos 1-266 de la SEQ ID NO: 1 a través del espaciador con la SEQ ID NO: 28 no cambió significativamente la capacidad de los constructos de administración con las SEQ ID NO: 32, 34 y 35 para inducir la dimerización del receptor de IL-22. La inducción de la dimerización del receptor de la IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22) se muestra mediante la curva negra.

El ensayo de activación de pSTAT3 se llevó a cabo usando células Colo205 incubadas con 10 µl de agonista (el constructo de administración respectivo o el control de IL-22) que tenía las varias concentraciones durante 15 min. Luego, se leyó el grado de activación de pSTAT3 usando placas MSD STAT3 (Nº de Cat. N450SMA-1).

La **FIG. 27C** muestra que la longitud de los espaciadores de aminoácidos con las SEQ ID NO: 13, 28 y 31 no afectó a la capacidad de IL-22 (SEQ ID NO: 11) cuando se incluyeron en los constructos de administración con las SEQ ID NO: 15, 32, y 33 para inducir la activación de pSTAT3. La activación de pSTAT3 de la IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22, SEQ ID NO: 12) se muestra mediante la curva negra.

La **FIG. 27D** muestra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 11) al extremo N- o C-terminal de un portador que comprende los residuos de aminoácidos 1-266 de la SEQ ID NO: 1 a través del espaciador con la SEQ ID NO: 28 no cambió significativamente la capacidad de los constructos de administración con las SEQ ID NO: 32, 34 y 35 para inducir la activación de pSTAT3. La activación de pSTAT3 de la IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22) se muestra mediante la curva negra.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Applied Molecular Transport Inc.

<120> CONSTRUCTOS DE ADMINISTRACIÓN PARA LA TRANSCITOSIS Y MÉTODOS RELACIONADOS

<130> P076717EP

5 <140> _____
 <141> 2019-11-07

<150> US 62/756,889
 <151> 2018-11-07

10 <150> US 62/888,133
 <151> 2019-08-16

<150> US 62/888,238
 <151> 2019-08-16

15 <150> PCT/US2019/050708
 <151> 2019-09-11

20 <150> PCT/US2019/021474
 <151> 2019-03-08

<160> 35

25 <170> SeqWin2010, versión 1.0

<210> 1
 <211> 634
 <212> PRT
 <213> Vibrio cholerae

30 <400> 1

35 Val Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30

40 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60

45 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80

50 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110

55 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125

60 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140

65

ES 2 911 075 T3

	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys	145	150	155	160
5	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile	165	170	175	
	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly	180	185	190	
10	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys	195	200	205	
15	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn	210	215	220	
	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala	225	230	235	240
20	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro	245	250	255	
25	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu	260	265	270	
	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser	275	280	285	
30	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala	290	295	300	
35	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His	305	310	315	320
	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	325	330	335	
40	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly	340	345	350	
45	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr	355	360	365	
	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala	370	375	380	
50	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Cys	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Ser	385	390	395	400
	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Asn	Asp	Gln	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ser	Arg	405	410	415	
55	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Ala	Val	Ile	Thr	Pro	Gln	420	425	430	
60	Gly	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Leu	Glu	Ala	Thr	His	Gln	Ala	435	440	445	
	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Tyr	His	Gly	Thr	Asn	His	450	455	460	
65	Val	Ala	Ala	Gln	Thr	Ile	Val	Asn	Arg	Ile	Ala	Pro	Val	Pro	Arg	Gly	465	470	475	480

ES 2 911 075 T3

	Asn	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Glu	Lys	Trp	Gly	Gly	Leu	Tyr	Val	Ala	Thr
					485					490					495	
5	His	Ala	Glu	Val	Ala	His	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ile	Lys	Glu	Gly	Thr	Gly
				500					505					510		
	Glu	Tyr	Gly	Leu	Pro	Thr	Arg	Ala	Glu	Arg	Asp	Ala	Arg	Gly	Val	Met
			515					520					525			
10	Leu	Arg	Val	Tyr	Ile	Pro	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Arg	Phe	Tyr	Arg	Thr
		530					535						540			
	Asn	Thr	Pro	Leu	Glu	Asn	Ala	Glu	Glu	His	Ile	Thr	Gln	Val	Ile	Gly
15	545					550					555					560
	His	Ser	Leu	Pro	Leu	Arg	Asn	Glu	Ala	Phe	Thr	Gly	Pro	Glu	Ser	Ala
					565					570					575	
20	Gly	Gly	Glu	Asp	Glu	Thr	Val	Ile	Gly	Trp	Asp	Met	Ala	Ile	His	Ala
				580					585					590		
	Val	Ala	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Tyr	Glu	Glu	Leu	Ala
25			595					600					605			
	Ile	Asp	Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Glu	Gln	Ser	Ile	Ser	Thr	Lys	Pro
		610					615					620				
30	Pro	Tyr	Lys	Glu	Arg	Lys	Asp	Glu	Leu	Lys						
	625					630										

35 <210> 2
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Vibrio cholerae

40 <400> 2

ES 2 911 075 T3

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

ES 2 911 075 T3

	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys
	145					150					155					160
5	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile
				165						170					175	
	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
10				180					185					190		
	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
			195					200					205			
15	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
	210						215					220				
	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala
20	225					230					235					240
	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro
				245						250					255	
25	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
30			275					280					285			
	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
	290						295					300				
35	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
				325						330					335	
40	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly
			340						345					350		
45	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr
			355					360					365			
	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala
	370						375					380				
50	Gln	Ala														
	385															
	<210> 3															
	<211> 266															
55	<212> PRT															
	<213> Vibrio cholerae															
	<400> 3															
60																

ES 2 911 075 T3

	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
			35					40					45			
10	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
		50					55					60				
15	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val
	65					70					75					80
	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu
					85					90					95	
20	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala
				100					105					110		
	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys
25			115					120					125			
	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro
		130					135					140				
30	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys
	145					150					155					160
	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile
35					165					170					175	
	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
				180					185					190		
40	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
			195					200					205			
	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
45		210					215					220				
	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala
	225					230					235					240
50	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro
					245					250					255	
	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly						
55				260					265							
	<210> 4															
	<211> 386															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
60	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix															
	<400> 4															
65																

ES 2 911 075 T3

	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
10			35					40					45			
	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
		50					55					60				
15																

ES 2 911 075 T3

	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val	65	70	75	80
5	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu		85	90	95
	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala		100	105	110
10	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys		115	120	125
15	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro		130	135	140
	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys	145	150	155	160
20	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile		165	170	175
25	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly		180	185	190
	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys		195	200	205
30	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn		210	215	220
35	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala	225	230	235	240
	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro		245	250	255
40	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu		260	265	270
45	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser		275	280	285
	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala	290	295	300	
50	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His	305	310	315	320
	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val		325	330	335
55	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly		340	345	350
60	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr		355	360	365
	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala		370	375	380
65	Gln	Ala															385			

<210> 5
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Constructo de toxina Cholix

<400> 5

10

Leu Glu Glu Ala Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15

15

Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45

20

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60

25

Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80

Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95

30

Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110

35

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125

Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140

40

Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
 145 150 155 160

45

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175

Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190

50

Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205

55

Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220

Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240

60

Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255

65

Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly
 260 265

5
10

<210> 6
<211> 387
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo de toxina Cholix

<400> 6

ES 2 911 075 T3

	Met	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	
				20					25					30			
	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	
			35					40					45				
10	Ile	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	
		50					55					60					
15	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	
	65					70					75					80	
	Val	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	
					85					90					95		
20	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	
				100					105					110			
25	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	
			115					120					125				
	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	
		130					135					140					
30	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	
	145					150					155					160	
35	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	
				165						170					175		
	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	
				180					185					190			
40	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	
			195					200					205				
45	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	
		210					215					220					
	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	
	225					230					235					240	
50	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	
					245					250					255		
55	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	
				260					265					270			
	Leu	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	
			275					280					285				
60	Ser	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	
		290					295					300					

65

ES 2 911 075 T3

	Ala	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	
	305					310					315					320	
5	His	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	
					325					330					335		
	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	
10				340					345					350			
	Gly	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	
		355						360					365				
15	Tyr	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	
	370						375					380					
	Ala	Gln	Ala														
20	385																
	<210> 7																
	<211> 267																
	<212> PRT																
25	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> Constructo de toxina Cholix																
30	<400> 7																

ES 2 911 075 T3

	Met	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	
				20					25					30			
	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	
10			35					40					45				
	Ile	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	
		50					55					60					
15	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	
	65				70						75					80	
	Val	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	
20					85				90						95		
	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	
				100					105					110			
25	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	
			115					120					125				
	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	
30		130					135					140					
	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	
	145					150					155					160	
35	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	
					165					170					175		
	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	
			195					200					205				
40	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	
		210					215					220					
	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	
45		225				230					235					240	
	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	
					245					250					255		
50	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly						
				260					265								

<210> 8

<211> 387

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo de toxina Cholix

60

<400> 8

ES 2 911 075 T3

	Met	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	
				20					25					30			
	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	
			35					40					45				
10	Ile	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	
		50					55					60					
15	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	
	65					70					75					80	
	Val	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	
					85					90					95		
20	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	
				100					105					110			
25	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	
			115					120					125				
	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	
		130					135					140					
30	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	
	145					150					155					160	
35	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	
					165					170					175		
	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	
				180					185					190			
40	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	
			195					200					205				

ES 2 911 075 T3

	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln
	210						215					220				
5	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val
	225					230					235					240
	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys
					245					250					255	
10	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala
				260					265					270		
15	Leu	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg
		275						280					285			
	Ser	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln
	290						295					300				
20	Ala	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser
	305					310					315					320
	His	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu
25					325					330					335	
	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro
				340					345					350		
30	Gly	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp
		355						360					365			
	Tyr	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly
35		370					375					380				
	Ala	Gln	Ala													
	385															
40	<210> 9															
	<211> 267															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
45	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix															
	<400> 9															
50																

ES 2 911 075 T3

	Met	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	
	1				5					10					15		
5	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	
				20					25					30			
	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	
			35					40					45				
10	Ile	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	
	50						55					60					
	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	
15	65					70					75					80	
	Val	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	
					85					90					95		
20	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	
				100					105					110			
	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	
25			115					120					125				
	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	
	130						135					140					
30	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	
	145					150					155					160	
	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	
35					165					170					175		
	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	
				180					185					190			
40	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	
			195					200					205				
	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	
45		210					215					220					
	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	
	225					230					235					240	
50	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	
					245					250					255		
	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly						
55				260					265								

<210> 10
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

ES 2 911 075 T3

	Met	Ala	Ala	Leu	Gln	Lys	Ser	Val	Ser	Ser	Phe	Leu	Met	Gly	Thr	Leu
	1				5					10					15	
5	Ala	Thr	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Val	Gln	Gly	Gly	Ala
				20					25					30		
	Ala	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln
			35					40					45			
10	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser
		50					55					60				
15	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe
	65					70					75					80
	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu
					85					90					95	
20	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln
				100					105					110		
25	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg
			115					120					125			
	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn
		130					135					140				
30	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu
	145					150					155					160
	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn
35					165					170					175	
	Ala	Cys	Ile													
40	<210> 11															
	<211> 146															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
45	<400> 11															

ES 2 911 075 T3

	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln
	1				5					10					15	
5	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu
				20					25					30		
	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	His
			35					40					45			
10	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	Asn
		50					55					60				
	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro
15	65					70					75					80
	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu
					85					90					95	
20	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	Val
				100					105					110		
	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile
25			115					120					125			
	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala
		130					135					140				
30	Cys	Ile														
	145															
35	<210> 12															
	<211> 147															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
40	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix															
	<400> 12															
45	Met	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln
	1				5					10					15	
	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser
				20					25					30		
50																

ES 2 911 075 T3

	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe
			35					40					45			
5	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu
		50					55					60				
	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln
	65					70					75					80
10	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg
					85					90					95	
	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn
15				100					105					110		
	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu
			115					120					125			
20	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn
		130					135					140				
	Ala	Cys	Ile													
25	145															
	<210> 13															
	<211> 15															
	<212> PRT															
30	<213> Conector															
	<400> 13															
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser															
35	1					5					10					15
	<210> 14															
	<211> 548															
	<212> PRT															
40	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22															
45	<400> 14															
50																

ES 2 911 075 T3

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

ES 2 911 075 T3

	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	
			115					120					125				
5	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	
		130					135					140					
	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	
	145					150					155					160	
10	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	
					165					170					175		
15	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	
				180					185					190			
	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	
			195					200					205				
20	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	
		210					215					220					
25	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	
	225					230					235					240	
	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	
					245					250					255		
30	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	
				260					265					270			
	Leu	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	
			275					280					285				
35	Ser	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	
		290					295					300					
40	Ala	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	
	305					310					315					320	
	His	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	
					325					330					335		
45	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	
				340					345					350			
50	Gly	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	
		355					360						365				
	Tyr	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	
		370					375					380					
55	Ala	Gln	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	385					390					395					400	
	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	
					405					410					415		
60	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	
				420					425					430			
65	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	
			435					440					445				

ES 2 911 075 T3

	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val
	450						455					460				
5	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe
	465					470					475					480
	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn
					485					490					495	
10	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg
				500					505					510		
15	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly
			515					520					525			
	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg
	530						535					540				
20	Asn	Ala	Cys	Ile												
	545															
25	<210> 15															
	<211> 428															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
30	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22															
	<400> 15															
35																

ES 2 911 075 T3

	Met	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys
	1				5					10					15	
5	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile
				20					25					30		
	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr
			35					40					45			
10	Ile	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser
		50					55					60				
15	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr
	65					70					75					80
	Val	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr
					85					90					95	
20	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe
				100					105					110		
25	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile
			115					120					125			
	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val
		130					135					140				
30	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp
	145					150					155					160
35	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn
				165						170					175	

40

ES 2 911 075 T3

	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu
				180					185					190		
5	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu
			195					200					205			
	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln
		210					215					220				
10	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val
	225					230					235					240
	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys
15					245					250					255	
	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
				260					265					270		
20	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His
			275					280					285			
	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg
25		290					295					300				
	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp
	305					310					315					320
30	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu
				325						330					335	
	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val
35				340					345					350		
	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val
			355					360					365			
40	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu
		370					375					380				
	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr
45		385				390					395					400
	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu
				405						410					415	
50	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Ile				
				420					425							

<210> 16

<211> 548

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo de toxina Cholix + IL22

60

<400> 16

65

ES 2 911 075 T3

	Met	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys
	1				5					10					15	
5	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile
				20					25					30		

10

ES 2 911 075 T3

	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	
			35					40					45				
5	Ile	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	
		50					55					60					
	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	
	65				70						75					80	
10	Val	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	
					85					90					95		
	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	
15				100					105					110			
	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	
			115					120					125				
20	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	
		130					135					140					
	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	
25	145					150					155					160	
	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	
					165					170					175		
30	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	
				180					185					190			
	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	
35			195					200					205				
	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	
		210					215					220					
40	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	
		225				230					235					240	
	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	
					245					250					255		
45	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	
				260					265					270			
	Leu	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	
50			275					280					285				
	Ser	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	
		290					295					300					
55	Ala	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	
		305				310					315					320	
	His	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	
60					325					330					335		
	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	
				340					345					350			
65	Gly	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	
			355					360					365				

ES 2 911 075 T3

	Tyr	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	
	370						375					380					
5	Ala	Gln	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	
	385					390					395					400	
	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	
					405					410					415		
10	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	
				420					425					430			
15	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	
			435					440					445				
	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	
	450						455					460					
20	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	
	465					470					475					480	
25	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	
					485					490					495		
	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	
				500					505					510			
30	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	
			515					520					525				
35	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	
	530						535					540					
	Asn	Ala	Cys	Ile													
	545																
40	<210> 17																
	<211> 428																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
45	<220>																
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22																
	<400> 17																
50																	

ES 2 911 075 T3

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

ES 2 911 075 T3

	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe
				100					105					110		
5	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile
			115					120					125			
	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val
		130					135					140				
10	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp
	145					150					155					160
	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn
15					165					170					175	
	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu
				180					185					190		
20	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu
			195					200					205			
	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln
25		210					215					220				
	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val
	225					230					235					240
30	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys
					245					250					255	
	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
35				260					265					270		
	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His
			275					280					285			
40	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg
		290					295					300				
	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp
45						310					315					320
	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu
				325						330					335	
	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val
50				340					345					350		
	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val
			355					360					365			
55	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu
		370					375					380				
	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr
60		385				390					395					400
	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu
				405						410					415	
65	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Ile				
				420					425							

5	<210> 18 <211> 547 <212> PRT <213> Secuencia Artificial
10	<220> <223> Constructo de toxina Cholix + IL22 <400> 18

ES 2 911 075 T3

	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
			35					40					45			
10	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
		50					55					60				
15	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val
	65					70					75					80
	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu
					85					90					95	
20	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala
				100					105					110		
25	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys
			115					120					125			
	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro
		130					135					140				
30	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys
	145					150					155					160
35	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile
				165						170					175	
	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
				180					185					190		
40	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
			195					200					205			
45	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
		210					215					220				
	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala
	225					230					235					240
50	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro
				245						250					255	
55	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
60																

ES 2 911 075 T3

	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala	
	290						295					300					
5	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His	
	305					310					315					320	
	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	
					325					330					335		
10	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly	
				340					345					350			
15	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr	
			355					360					365				
	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala	
	370						375					380					
20	Gln	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
	385					390					395					400	
	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	
25					405					410					415		
	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	
				420					425					430			
30	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	
			435					440					445				
	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	
35		450					455					460					
	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	
	465					470					475					480	
40	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	
					485					490					495		
	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	
45				500					505					510			
	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	
			515					520					525				
50	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	
		530					535					540					
55	Ala	Cys	Ile														
	545																
	<210> 19																
	<211> 547																
	<212> PRT																
60	<213> Secuencia Artificial																
	<220>																
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22																
65	<400> 19																

Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
1				5					10					15	

ES 2 911 075 T3

	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro	
				20					25					30			
5	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile	
			35				40						45				
	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile	
		50					55					60					
10	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val	
	65					70					75					80	
	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu	
15					85					90					95		
	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala	
				100					105					110			
20	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys	
			115					120					125				
	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro	
25		130					135					140					
	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys	
	145					150					155					160	
30	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile	
				165						170					175		
	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly	
35				180					185					190			
	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys	
			195					200					205				
40	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn	
	210						215					220					
	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala	
	225					230					235					240	
45	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro	
				245						250					255		
	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu	
50				260					265					270			
	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser	
			275					280					285				
55	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala	
		290					295					300					
	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His	
60	305					310					315					320	
	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	
				325						330					335		
65	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly	
				340					345					350			

ES 2 911 075 T3

	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr
			355					360					365			
5	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala
		370					375					380				
	Gln	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	385					390					395					400
10	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln
				405						410					415	
	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser
15				420					425					430		
	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe
		435						440					445			
20	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu
		450					455					460				
	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln
25	465					470					475					480
	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg
				485						490					495	
30	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn
				500					505					510		
	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu
35			515					520					525			
	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn
	530						535					540				
40	Ala	Cys	Ile													
	545															
45	<210> 20															
	<211> 427															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
50	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22															
	<400> 20															
55																

ES 2 911 075 T3

	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
10			35					40					45			
	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
		50					55					60				
15	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val
	65					70					75					80
20																

ES 2 911 075 T3

	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu	
					85					90						95	
5	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala	
				100					105					110			
	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys	
			115					120					125				
10	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro	
		130					135					140					
15	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys	
	145					150					155					160	
	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile	
				165						170					175		
20	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly	
				180					185					190			
25	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys	
			195					200					205				
	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn	
		210					215					220					
30	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala	
	225					230					235					240	
	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro	
				245						250					255		
35	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
				260					265						270		
40	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	
			275					280					285				
	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	
		290					295					300					
45	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	
	305					310					315					320	
50	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	
				325						330					335		
	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	
			340						345					350			
55	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	
			355					360					365				
60	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	
		370					375					380					
	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	
	385					390					395					400	
65	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	
				405						410					415		

ES 2 911 075 T3

Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys Ile
420 425

- 5 <210> 21
<211> 427
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Constructo de toxina Cholix + IL22

<400> 21
- 15

ES 2 911 075 T3

	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
			35					40					45			
10	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
		50					55					60				
15	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val
	65					70					75					80
	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu
					85					90					95	
20	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala
				100					105					110		
25	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys
			115					120					125			
	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro
		130					135					140				
30	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys
	145					150					155					160
35	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile
				165						170					175	
	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
				180					185					190		
40	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
			195					200					205			
45	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
		210					215					220				
	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala
	225					230					235					240
50	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro
				245						250					255	
55	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
			260						265					270		

ES 2 911 075 T3

	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys
			275					280					285			
5	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr
	290						295					300				
	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val
	305					310					315					320
10	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg
					325					330					335	
	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu
15				340					345					350		
	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro
			355					360					365			
20	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly
	370						375					380				
	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val
25	385					390					395					400
	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp
					405					410					415	
30	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Ile					
				420					425							
35	<210> 22															
	<211> 634															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
40	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix															
	<400> 22															
45																

ES 2 911 075 T3

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

	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro
	130						135					140				
5	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys
	145					150					155					160
	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile
					165					170					175	
10	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
				180					185					190		
	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
15			195					200					205			
	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
	210						215					220				
20	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala
	225					230					235					240
	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro
25					245					250					255	
	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
30	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
35		290					295					300				
	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
40	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
					325					330					335	
	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly
				340					345					350		
45	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr
		355						360					365			
	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala
50		370					375					380				
	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Cys	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Ser
	385					390					395					400
55	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Asn	Asp	Gln	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ser	Arg
					405					410					415	
	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Ala	Val	Ile	Thr	Pro	Gln
60				420					425					430		
	Gly	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Leu	Glu	Ala	Thr	His	Gln	Ala
			435					440					445			
65	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Tyr	His	Gly	Thr	Asn	His
	450						455					460				

ES 2 911 075 T3

	Val	Ala	Ala	Gln	Thr	Ile	Val	Asn	Arg	Ile	Ala	Pro	Val	Pro	Arg	Gly
	465					470					475					480
5	Asn	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Glu	Lys	Trp	Gly	Gly	Leu	Tyr	Val	Ala	Thr
				485						490					495	
	His	Ala	Glu	Val	Ala	His	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ile	Lys	Glu	Gly	Thr	Gly
			500						505					510		
10	Glu	Tyr	Gly	Leu	Pro	Thr	Arg	Ala	Glu	Arg	Asp	Ala	Arg	Gly	Val	Met
			515					520					525			
15	Leu	Arg	Val	Tyr	Ile	Pro	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Arg	Phe	Tyr	Arg	Thr
	530						535					540				
	Asn	Thr	Pro	Leu	Glu	Asn	Ala	Glu	Glu	His	Ile	Thr	Gln	Val	Ile	Gly
	545				550						555					560
20	His	Ser	Leu	Pro	Leu	Arg	Asn	Glu	Ala	Phe	Thr	Gly	Pro	Glu	Ser	Ala
				565						570					575	
25	Gly	Gly	Glu	Asp	Glu	Thr	Val	Ile	Gly	Trp	Asp	Met	Ala	Ile	His	Ala
			580						585					590		
	Val	Ala	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Tyr	Glu	Glu	Leu	Ala
		595						600					605			
30	Ile	Asp	Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Glu	Gln	Ser	Ile	Ser	Thr	Lys	Pro
	610						615					620				
35	Pro	Tyr	Lys	Glu	Arg	Lys	Asp	Glu	Leu	Lys						
	625					630										
	<210> 23															
	<211> 635															
	<212> PRT															
40	<213> Secuencia Artificial															
	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix															
45	<400> 23															
50																

ES 2 911 075 T3

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

ES 2 911 075 T3

	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	
			115					120					125				
5	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	
		130					135					140					
	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	
	145					150					155					160	
10	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	
					165					170					175		
15	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	
				180					185					190			
	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	
			195					200					205				
20	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	
		210					215					220					
25	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	
	225				230						235					240	
	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	
					245					250					255		
30	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	
				260					265					270			
	Leu	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	
			275					280					285				
35	Ser	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	
		290					295					300					
40	Ala	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	
	305					310					315					320	
	His	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	
					325					330					335		
45	Val	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	
				340					345					350			
50	Gly	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	
		355						360					365				
	Tyr	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	
		370					375					380					
55	Ala	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Cys	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	
	385					390					395					400	
60	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Asn	Asp	Gln	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ser	
					405					410					415		
	Arg	Ser	Gly	Arg	Ser	Tyr	Leu	Pro	Glu	Asn	Arg	Ala	Val	Ile	Thr	Pro	
				420					425					430			
65	Gln	Gly	Val	Thr	Asn	Trp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Leu	Glu	Ala	Thr	His	Gln	
			435					440					445				

ES 2 911 075 T3

	Ala	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Tyr	His	Gly	Thr	Asn
	450						455					460				
5	His	Val	Ala	Ala	Gln	Thr	Ile	Val	Asn	Arg	Ile	Ala	Pro	Val	Pro	Arg
	465					470					475					480
	Gly	Asn	Asn	Thr	Glu	Asn	Glu	Glu	Lys	Trp	Gly	Gly	Leu	Tyr	Val	Ala
					485					490					495	
10	Thr	His	Ala	Glu	Val	Ala	His	Gly	Tyr	Ala	Arg	Ile	Lys	Glu	Gly	Thr
				500					505					510		
	Gly	Glu	Tyr	Gly	Leu	Pro	Thr	Arg	Ala	Glu	Arg	Asp	Ala	Arg	Gly	Val
15			515					520					525			
	Met	Leu	Arg	Val	Tyr	Ile	Pro	Arg	Ala	Ser	Leu	Glu	Arg	Phe	Tyr	Arg
	530						535					540				
20	Thr	Asn	Thr	Pro	Leu	Glu	Asn	Ala	Glu	Glu	His	Ile	Thr	Gln	Val	Ile
	545					550					555					560
	Gly	His	Ser	Leu	Pro	Leu	Arg	Asn	Glu	Ala	Phe	Thr	Gly	Pro	Glu	Ser
25					565					570					575	
	Ala	Gly	Gly	Glu	Asp	Glu	Thr	Val	Ile	Gly	Trp	Asp	Met	Ala	Ile	His
				580					585					590		
30	Ala	Val	Ala	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Pro	Gly	Asn	Ala	Tyr	Glu	Glu	Leu
			595					600					605			
	Ala	Ile	Asp	Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Lys	Glu	Gln	Ser	Ile	Ser	Thr	Lys
35		610					615					620				
	Pro	Pro	Tyr	Lys	Glu	Arg	Lys	Asp	Glu	Leu	Lys					
	625					630					635					
40	<210> 24															
	<211> 427															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
45	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22															
	<400> 24															
50																

ES 2 911 075 T3

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

ES 2 911 075 T3

	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala	
				100					105					110			
5	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys	
			115					120					125				
	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro	
		130					135					140					
10	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys	
	145					150					155					160	
	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile	
15					165					170					175		
	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly	
				180					185					190			
20	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys	
			195					200					205				
	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn	
25		210					215					220					
	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala	
	225					230					235					240	
30	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro	
					245					250					255		
	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	
				260					265					270			
35	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	
			275					280					285				
	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	
40		290					295					300					
	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	
	305					310					315					320	
45	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	
					325					330					335		
	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	
50				340					345					350			
	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	
			355					360					365				
55	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	
		370					375					380					
	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	
60		385				390					395					400	
	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	
					405					410					415		
65	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Ile						
				420					425								

5	<210> 25
	<211> 427
	<212> PRT
	<213> Secuencia Artificial
10	<220>
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22
	<400> 25

ES 2 911 075 T3

	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
			35					40					45			
10	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
		50					55					60				
	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val
15	65					70					75					80
	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu
					85					90					95	
20	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala
				100					105					110		
	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys
25			115					120					125			
	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro
		130					135					140				
30	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys
	145					150					155					160
	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile
35					165					170					175	
	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
				180					185					190		
40	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
			195					200					205			
	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
45		210					215					220				
	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala
	225					230					235					240
50	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro
					245					250					255	
	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
55				260					265					270		
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys
			275					280					285			
60																

ES 2 911 075 T3

	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr
	290						295					300				
5	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val
	305					310					315					320
	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg
					325					330					335	
10	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu
				340					345					350		
15	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro
			355					360					365			
	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly
	370						375					380				
20	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val
	385					390					395					400
	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp
25					405					410					415	
	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Ile					
				420					425							
30	<210> 26															
	<211> 634															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
35	<220>															
	<223> Variantes de toxina Cholix															
	<220>															
40	<221> característica_misc															
	<222> 1, 3, 4, 6, 16, 21, 24, 30, 33, 56, 59, 67, 73, 81, 90, 101, 104,															
	108, 109, 112, 114, 118, 119, 131, 134, 137, 160, 161, 166, 168, 174, 175,															
	186, 189, 191, 193, 200, 202, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 211, 212, 213,															
45	214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 227, 229, 230, 232,															
	235, 237, 242, 244, 245, 247, 252, 256, 265, 266, 269, 270, 271, 288, 293,															
	295, 299, 301, 303, 306, 312, 316, 319, 321, 324, 330, 331, 333, 335, 337,															
	341, 342, 343, 345, 349, 353, 355, 360, 371, 374, 376, 383, 393, 394, 397,															
	399, 400, 404, 405, 406, 413, 423, 431, 443, 444, 445, 448, 451, 453, 465,															
	469, 475, 481, 482, 485, 487, 488, 492, 495, 497, 499, 500, 501, 502, 503,															
50	505, 507, 508, 509, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 519, 520, 521, 522, 523,															
	524, 530, 533, 534, 535, 544, 546, 547, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556,															
	557, 562, 573, 574, 575, 576, 577, 579, 580, 583, 588, 591, 592, 603, 605,															
	606, 608, 609, 610, 614, 616, 622, 629, 630															
55	<223> 'Xaa' es cualquier aminoácido como se define en la Tabla 1															
	<400> 26															
60																

ES 2 911 075 T3

	Xaa	Glu	Xaa	Xaa	Leu	Xaa	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Xaa
	1				5					10					15	
5	Leu	Thr	Pro	Glu	Xaa	Gly	Lys	Xaa	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Xaa	Ile	Pro
				20					25					30		
	Xaa	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
10			35					40					45			
	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Xaa	Asp	Glu	Xaa	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
15																

ES 2 911 075 T3

	50		55		60											
5	Ile 65	Thr	Xaa	Gly	Glu	Phe 70	Ala	Thr	Xaa	Arg	Ala 75	Thr	Arg	His	Tyr	Val 80
	Xaa	Gln	Asp	Ala	Pro 85	Phe	Gly	Val	Ile	Xaa 90	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu 95
10	Asn	Gly	Thr	Lys 100	Xaa	Tyr	Ser	Xaa	Asn 105	Arg	Lys	Xaa	Xaa	Glu 110	Phe	Xaa
	Ile	Xaa	Trp	Leu	Val	Xaa	Xaa	Gly 120	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala 125	Ser	Ile	Lys
15	Ile 130	Ser	Xaa	Asp	Glu	Xaa	Asp 135	Gln	Xaa	Arg	Asn	Ile 140	Ile	Glu	Val	Pro
20	Lys 145	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp 150	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr 155	Leu	Glu	Gln	Trp	Xaa 160
	Xaa	Gln	Gly	Asn 165	Val	Xaa	Phe	Xaa	Val	Thr 170	Arg	Pro	Glu	Xaa	Xaa	Ile 175
25	Ala	Ile	Ser	Trp 180	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr 185	Xaa	Ala	Ala	Xaa	Lys 190	Xaa	Gly
	Xaa	Arg	His 195	Lys	Arg	Trp	Ala	Xaa 200	Trp	Xaa	Thr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
30	Xaa 210	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
35	Cys 225	Thr	Xaa	Gly	Xaa	Xaa	Trp	Xaa	Gly	Gly	Xaa 235	Tyr	Xaa	Thr	Val	Ala 240
	Gly	Xaa	Pro	Xaa	Xaa 245	Ile	Xaa	Val	Lys	Gln 250	Gly	Xaa	Glu	Gln	Lys	Xaa 255
40	Val	Glu	Gln	Arg 260	Ile	His	Phe	Ser	Xaa 265	Xaa	Asn	Ala	Xaa	Xaa	Xaa	Leu
	Ala	Ala	His 275	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu 285	Ala	Arg	Xaa
45	Arg 290	Lys	Pro	Arg	Xaa	Leu	Xaa 295	Asp	Asp	Leu	Xaa	Cys 300	Xaa	Tyr	Xaa	Ala
50	Gln 305	Xaa	Ile	Val	Ser	Leu 310	Phe	Xaa	Ala	Thr	Arg 315	Xaa	Leu	Phe	Xaa	His 320
	Xaa	Asp	Ser	Xaa	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Xaa 330	Xaa	Gln	Xaa	Pro	Xaa	Val 335
55	Xaa 340	Glu	Arg	Leu	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Xaa 345	Ile	Asn	Glu	Xaa	Asn 350	Pro	Gly
60	Xaa 355	Val	Xaa	Gln	Val	Leu	Thr	Xaa 360	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr 365	Asn	Asp	Tyr
	Val	Thr	Xaa	His	Pro	Xaa	Leu 375	Xaa	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Xaa	Ala
65	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Xaa	Xaa	Pro	Asp	Xaa	Asp	Xaa	Xaa

ES 2 911 075 T3

	385		390		395		400
5	Cys Val Ala Xaa Xaa Xaa Asp Gln Ala Asn Ile Asn Xaa Glu Ser Arg	405	410	415			
	Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Xaa Glu Asn Arg Ala Val Ile Thr Xaa Gln	420	425	430			
10	Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu Leu Xaa Xaa Xaa His Gln Xaa	435	440	445			
	Leu Thr Xaa Glu Xaa Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Asn His	450	455	460			
15	Xaa Ala Ala Gln Xaa Ile Val Asn Arg Ile Xaa Pro Val Pro Arg Gly	465	470	475	480		
20	Xaa Xaa Thr Glu Xaa Glu Xaa Xaa Trp Gly Gly Xaa Tyr Val Xaa Thr	485	490	495			
	Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Gly Thr Xaa	500	505	510			
25	Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Gly Val Met	515	520	525			
30	Leu Xaa Val Tyr Xaa Xaa Xaa Ala Ser Leu Glu Arg Phe Tyr Arg Xaa	530	535	540			
	Asn Xaa Xaa Leu Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Ile Gly	545	550	555	560		
35	His Xaa Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala Phe Thr Gly Xaa Xaa Xaa Xaa	565	570	575			
40	Xaa Gly Xaa Xaa Glu Thr Xaa Ile Gly Trp Asp Xaa Ala Ile Xaa Xaa	580	585	590			
	Val Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly Asn Xaa Tyr Xaa Xaa Leu Xaa	595	600	605			
45	Xaa Xaa Glu Glu Ala Xaa Ala Xaa Glu Gln Ser Ile Ser Xaa Lys Pro	610	615	620			
50	Pro Tyr Lys Glu Xaa Xaa Asp Glu Leu Lys	625	630				

<210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Conector

<400> 27

Gly Gly Gly Ser
 1

5	<210> 28 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Conector	
15	<400> 28	Gly Gly Gly Gly Ser 1 5
20	<210> 29 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Conector	
30	<400> 29	Gly Gly Gly Gly Gly Ser 1 5
35	<210> 30 <211> 179 <212> PRT <213> Mus musculus	
	<400> 30	

ES 2 911 075 T3

	Met	Ala	Val	Leu	Gln	Lys	Ser	Met	Ser	Phe	Ser	Leu	Met	Gly	Thr	Leu
	1				5					10					15	
5	Ala	Ala	Ser	Cys	Leu	Leu	Leu	Ile	Ala	Leu	Trp	Ala	Gln	Glu	Ala	Asn
				20					25				30			
	Ala	Leu	Pro	Val	Asn	Thr	Arg	Cys	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Asn	Phe	Gln
			35					40					45			
10	Gln	Pro	Tyr	Ile	Val	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser
		50					55					60				
15	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe
	65					70					75					80
	Arg	Gly	Val	Ser	Ala	Lys	Asp	Gln	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu
					85					90					95	
20	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Asp	Val	Leu	Leu	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln
				100					105					110		
25	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Thr	Lys	Leu	Ser	Asn	Gln
			115					120					125			
	Leu	Ser	Ser	Cys	His	Ile	Ser	Gly	Asp	Asp	Gln	Asn	Ile	Gln	Lys	Asn
		130					135					140				
30	Val	Arg	Arg	Leu	Lys	Glu	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu
	145					150					155					160
	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn
35					165					170					175	
	Ala	Cys	Val													
40	<210> 31															
	<211> 25															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
45	<220>															
	<223> Conector															
	<400> 31															
50	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
	1				5					10					15	
	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser							
				20					25							
55	<210> 32															
	<211> 418															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia Artificial															
60	<220>															
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22															
65	<400> 32															

ES 2 911 075 T3

	Met	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys
	1				5					10					15	
5	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile
				20					25					30		
	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr
			35					40					45			
10	Ile	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser
	50						55					60				
15	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr
	65					70					75					80
	Val	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr
					85					90					95	
20	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe
				100					105					110		
25	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile
			115					120					125			
	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val
	130						135					140				
30	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp
	145					150					155					160
35	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn
					165					170					175	
	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu
				180					185					190		
40	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu
			195					200					205			
45	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln

ES 2 911 075 T3

	210	215	220	
5	Asn Cys Thr Leu Gly Asp 225	Asn Trp Phe Gly Gly 230	Ser Tyr Glu Thr Val 235	
	Ala Gly Thr Pro Lys Val 245	Ile Thr Val Lys Gln 250	Gly Ile Glu Gln Lys 255	
10	Pro Val Glu Gln Arg Ile 260	His Phe Ser Lys Gly 265	Gly Gly Gly Gly Ser 270	
	Ala Pro Ile Ser Ser His 275	Cys Arg Leu Asp Lys 280	Ser Asn Phe Gln Gln 285	
15	Pro Tyr Ile Thr Asn Arg 290	Thr Phe Met Leu Ala 295	Lys Glu Ala Ser Leu 300	
20	Ala Asp Asn Asn Thr Asp 305	Val Arg Leu Ile Gly 310	Glu Lys Leu Phe His 315	
	Gly Val Ser Met Ser Glu 325	Arg Cys Tyr Leu Met 330	Lys Gln Val Leu Asn 335	
25	Phe Thr Leu Glu Glu Val 340	Leu Phe Pro Gln Ser 345	Asp Arg Phe Gln Pro 350	
30	Tyr Met Gln Glu Val Val 355	Pro Phe Leu Ala Arg 360	Leu Ser Asn Arg Leu 365	
	Ser Thr Cys His Ile Glu 370	Gly Asp Asp Leu His 375	Ile Gln Arg Asn Val 380	
35	Gln Lys Leu Lys Asp Thr 385	Val Lys Lys Leu Gly 390	Glu Ser Gly Glu Ile 395	
40	Lys Ala Ile Gly Glu Leu 405	Asp Leu Leu Phe Met 410	Ser Leu Arg Asn Ala 415	
	Cys Ile			
45	<210> 33			
	<211> 438			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia Artificial			
50	<220>			
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22			
	<400> 33			
55	Met Val Glu Glu Ala Leu Asn 1	Ile Phe Asp Glu Cys Arg 10	Ser Pro Cys 15	
	Ser Leu Thr Pro Glu Pro Gly 20	Lys Pro Ile Gln Ser Lys 25	Leu Ser Ile 30	
60	Pro Ser Asp Val Val Leu Asp 35	Glu Gly Val Leu Tyr 40	Tyr Ser Met Thr 45	
	Ile Asn Asp Glu Gln Asn 50	Asp Ile Lys Asp Glu Asp 55	Lys Gly Glu Ser 60	
65	Ile Ile Thr Ile Gly Glu Phe 1	Ala Thr Val Arg Ala Thr 10	Arg His Tyr 15	

ES 2 911 075 T3

	65				70					75					80		
5	Val	Asn	Gln	Asp	Ala 85	Pro	Phe	Gly	Val	Ile 90	His	Leu	Asp	Ile	Thr 95	Thr	
	Glu	Asn	Gly	Thr 100	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr 105	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly 110	Glu	Phe	
10	Ala	Ile	Asn	Trp 115	Leu	Val	Pro	Ile 120	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	
	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp 135	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	
15	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile 150	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp 160	
20	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn 165	Val	Ser	Phe	Ser	Val 170	Thr	Arg	Pro	Glu	His 175	Asn	
	Ile	Ala	Ile	Ser 180	Trp	Pro	Ser	Val	Ser 185	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln 190	Lys	Glu	
25	Gly	Ser	Arg 195	His	Lys	Arg	Trp	Ala 200	His	Trp	His	Thr	Gly 205	Leu	Ala	Leu	
	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp 215	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr 220	Ile	Thr	Gln	Gln	
30	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp 230	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly 235	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val 240	
35	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys 245	Val	Ile	Thr	Val	Lys 250	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln 255	Lys	
	Pro	Val	Glu	Gln 260	Arg	Ile	His	Phe	Ser 265	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly 270	Gly	Ser	
40	Gly	Gly	Gly 275	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly 280	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly 285	Gly	Ser	Gly	
	Gly	Gly	Gly 290	Ser	Ala	Pro	Ile 295	Ser	Ser	His	Cys	Arg 300	Leu	Asp	Lys	Ser	
45	Asn	Phe	Gln	Gln	Pro	Tyr 310	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr 315	Phe	Met	Leu	Ala	Lys 320	
50	Glu	Ala	Ser	Leu 325	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp 330	Val	Arg	Leu	Ile	Gly 335	Glu	
	Lys	Leu	Phe	His 340	Gly	Val	Ser	Met	Ser 345	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	
55	Gln	Val	Leu 355	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu 360	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	
	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln 375	Glu	Val	Val	Pro	Phe 380	Leu	Ala	Arg	Leu	
60	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr 390	Cys	His	Ile	Glu	Gly 395	Asp	Asp	Leu	His	Ile 400	
65	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	

ES 2 911 075 T3

				405					410					415			
5	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	
				420					425					430			
	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Ile											
				435													
10	<210> 34																
	<211> 418																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
15	<220>																
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22																
20	<400> 34																
25																	

ES 2 911 075 T3

	Met	Ala	Pro	Ile	Ser	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Asp	Lys	Ser	Asn	Phe	Gln
	1				5					10					15	
5	Gln	Pro	Tyr	Ile	Thr	Asn	Arg	Thr	Phe	Met	Leu	Ala	Lys	Glu	Ala	Ser
				20					25					30		
	Leu	Ala	Asp	Asn	Asn	Thr	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Gly	Glu	Lys	Leu	Phe
10			35					40					45			
	His	Gly	Val	Ser	Met	Ser	Glu	Arg	Cys	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu
		50					55					60				
15	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln
	65					70					75					80
	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg
20					85					90					95	
	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn
				100					105					110		
25	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu
			115					120					125			
	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn
30		130					135					140				
	Ala	Cys	Ile	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Leu	Asn	Ile	Phe
	145					150					155					160
35	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro
					165					170					175	
	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly
40				180					185					190		
	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys
			195					200					205			
45	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr
		210					215					220				
	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val
50		225				230					235					240
	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr

55

ES 2 911 075 T3

				245					250					255			
5	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	
				260					265					270			
	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	
			275					280					285				
10	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	
	290						295					300					
15	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	
	305					310					315					320	
	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	
					325					330					335		
20	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	
			340						345					350			
25	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	
			355					360					365				
	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	
	370						375					380					
30	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	
	385					390					395					400	
35	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	
				405						410					415		
	Lys	Gly															
40	<210> 35																
	<211> 538																
	<212> PRT																
	<213> Secuencia Artificial																
45	<220>																
	<223> Constructo de toxina Cholix + IL22																
	<400> 35																
50																	

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

[illegible]

ES 2 911 075 T3

	435						440					445				
5	Tyr	Leu	Met	Lys	Gln	Val	Leu	Asn	Phe	Thr	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Phe
	450						455					460				
	Pro	Gln	Ser	Asp	Arg	Phe	Gln	Pro	Tyr	Met	Gln	Glu	Val	Val	Pro	Phe
	465					470					475					480
10	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Asn	Arg	Leu	Ser	Thr	Cys	His	Ile	Glu	Gly	Asp
					485					490					495	
	Asp	Leu	His	Ile	Gln	Arg	Asn	Val	Gln	Lys	Leu	Lys	Asp	Thr	Val	Lys
15				500					505					510		
	Lys	Leu	Gly	Glu	Ser	Gly	Glu	Ile	Lys	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	Asp	Leu
			515					520					525			
20	Leu	Phe	Met	Ser	Leu	Arg	Asn	Ala	Cys	Ile						
	530						535									
25																

REIVINDICACIONES

1. Un constructo de administración que comprende un portador acoplado a una IL-22 humana, en donde el portador consiste de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 o 9.
2. El constructo de administración de la reivindicación 1, en donde la IL-22 humana consiste de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11.
3. El constructo de administración de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el portador se acopla covalentemente o no covalente a la IL-22 humana.
4. El constructo de administración de la reivindicación 3, en donde el portador se acopla covalentemente a la IL-22 humana a través de un espaciador.
5. El constructo de administración de la reivindicación 4, en donde el espaciador consiste de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 13
6. El constructo de administración de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el constructo de administración consiste de una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o 17.
7. El constructo de administración de la reivindicación 6, en donde el constructo de administración consiste de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15.
8. El constructo de administración de la reivindicación 6, en donde el constructo de administración consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.
9. El constructo de administración de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para su uso en un método para tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto, el método comprendiendo administrar al sujeto una cantidad eficaz de un constructo de administración de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. El constructo de administración de la reivindicación 9, en donde la enfermedad inflamatoria es hepatitis, obesidad, enfermedad del hígado graso, inflamación del hígado o pancreatitis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, reservoritis, proctitis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de injerto contra huésped, artritis reumatoide o psoriasis.
11. El constructo de administración de la reivindicación 10, en donde la enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.
12. El constructo de administración de la reivindicación 11, en donde la enfermedad inflamatoria es la enfermedad de Crohn.
13. El constructo de administración de la reivindicación 11, en donde la enfermedad inflamatoria es colitis ulcerosa.
14. El constructo de administración de la reivindicación 10, en donde la enfermedad es artritis reumatoide.
15. Un constructo de administración que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 17, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 17.
16. El constructo de administración de la reivindicación 15, en donde la secuencia de aminoácidos tiene por lo menos un 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 17.

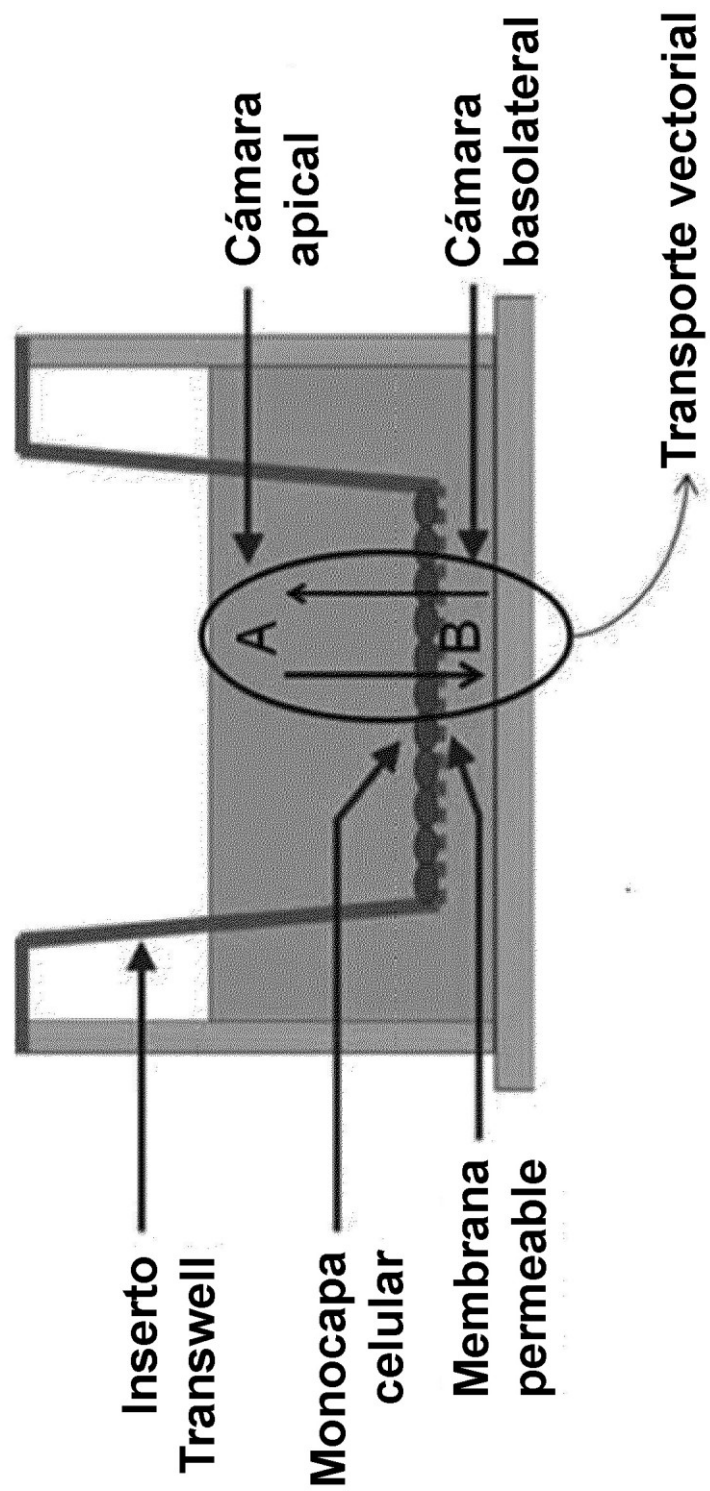
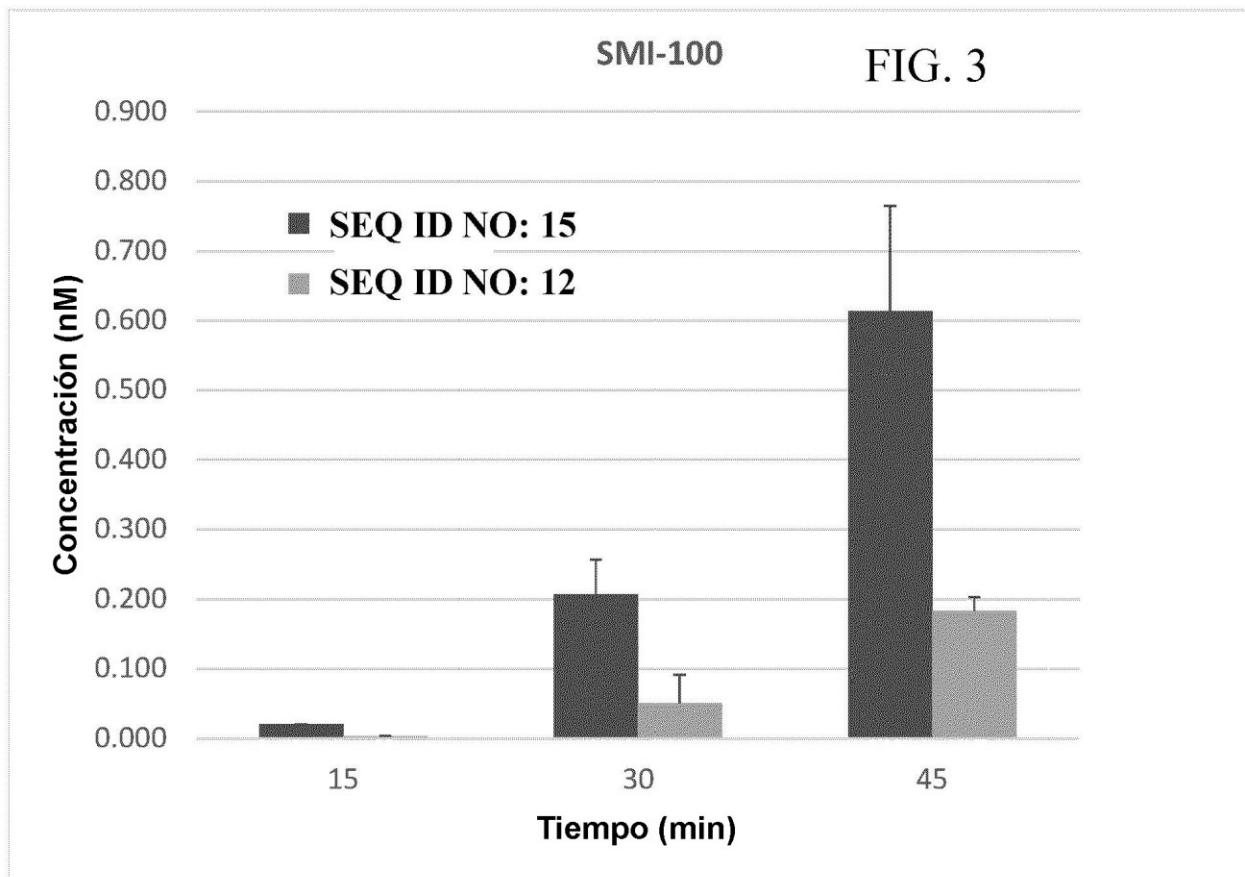
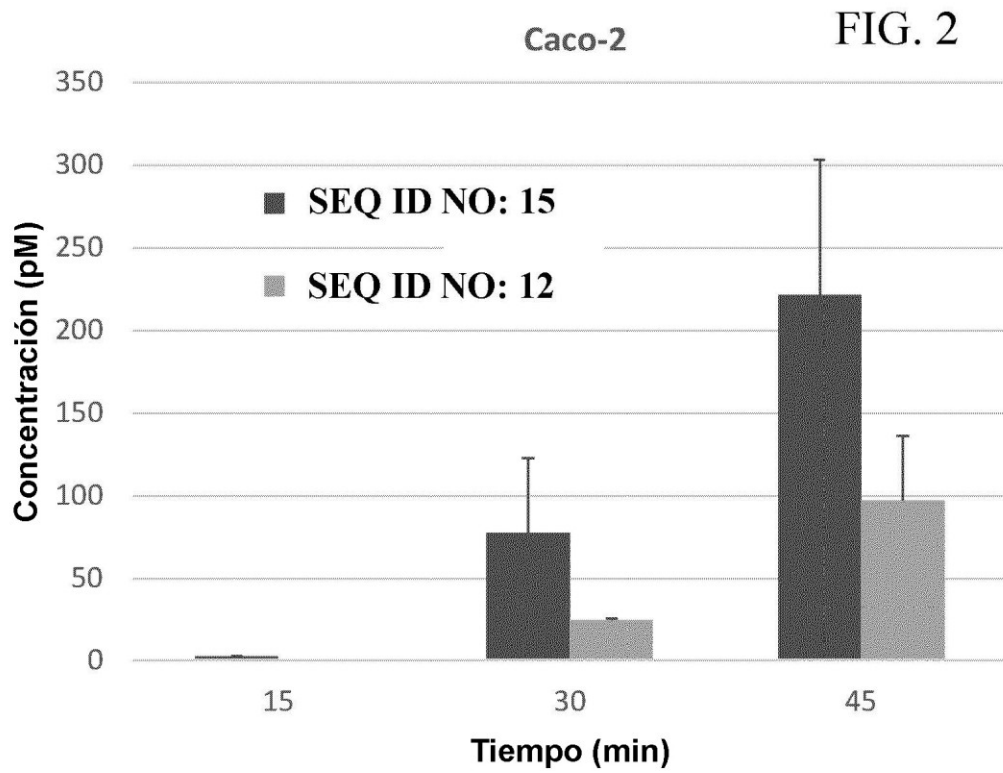


FIG. 1



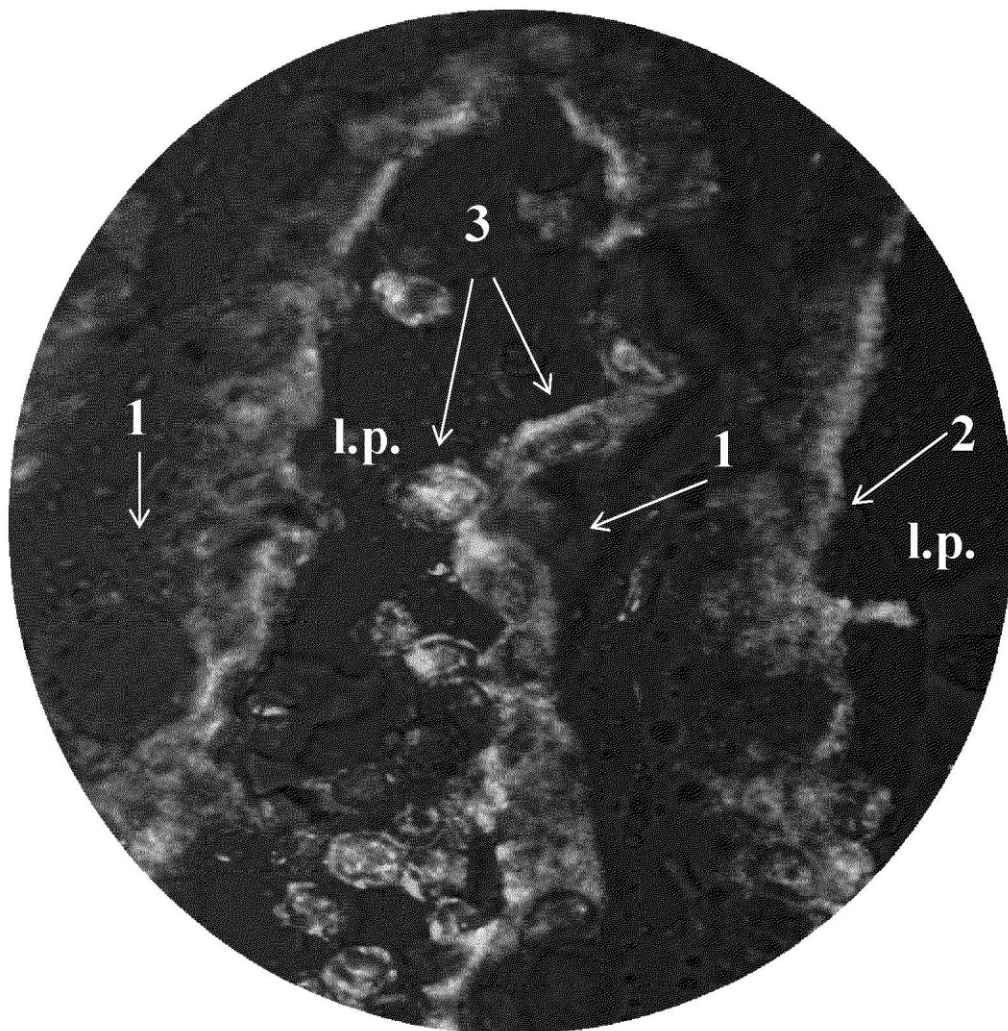


FIG. 4

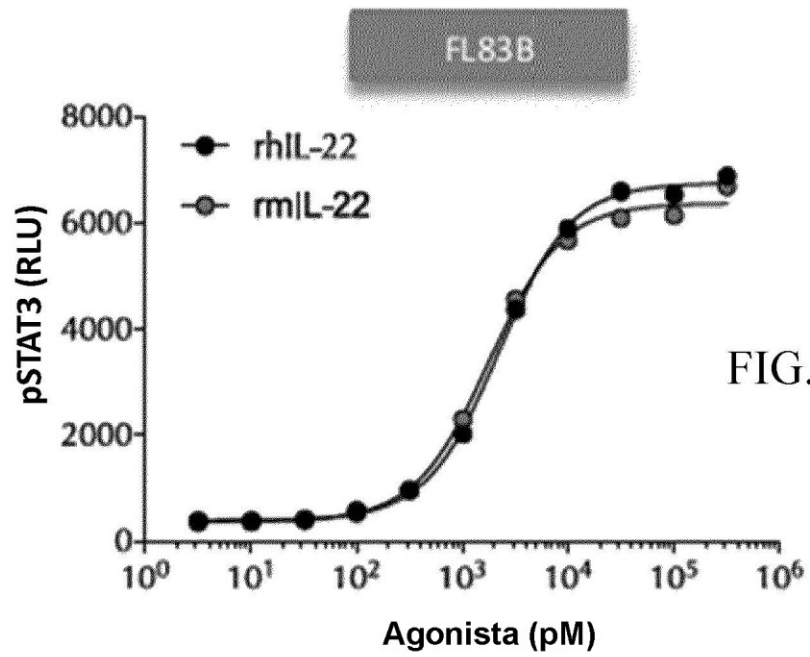


FIG. 5A

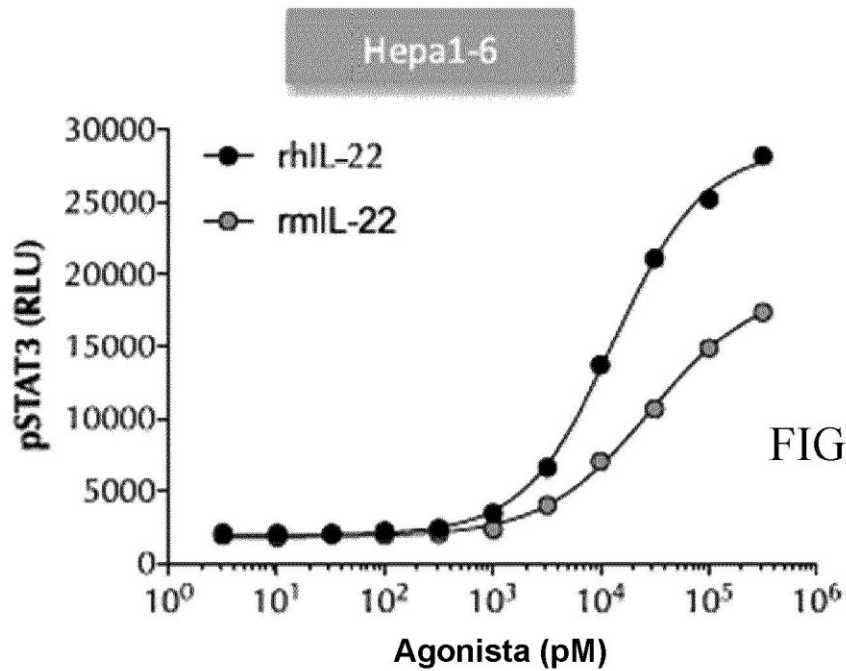
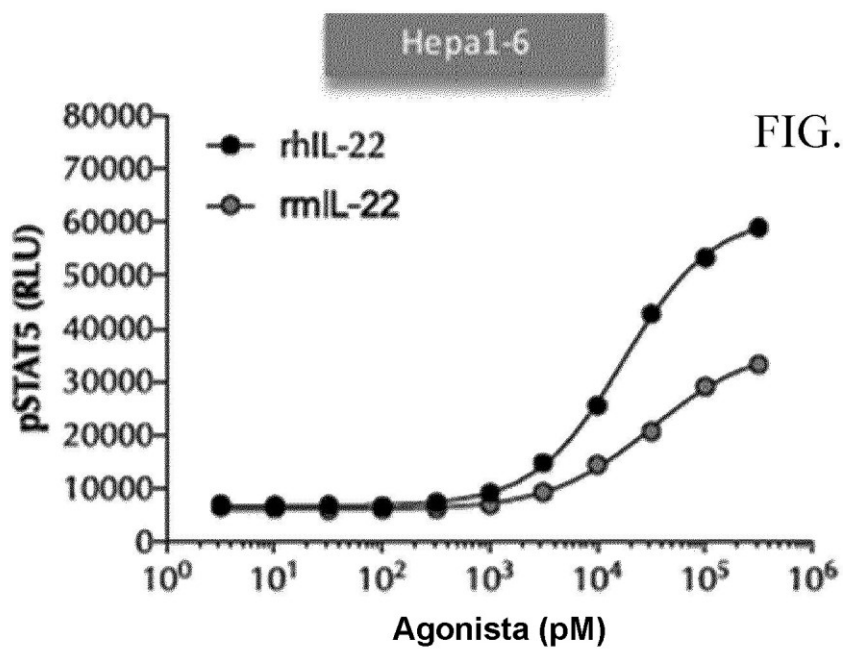
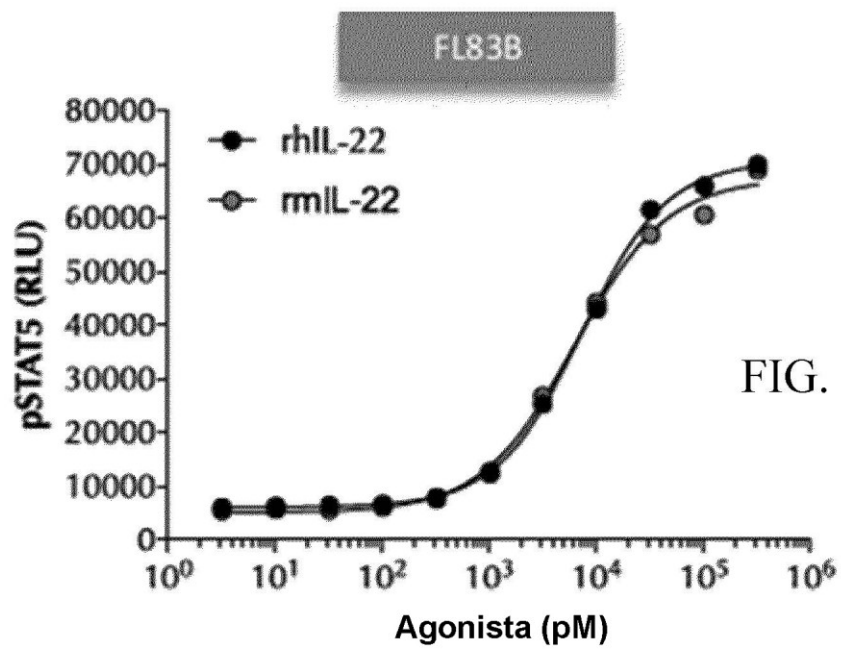


FIG. 5B



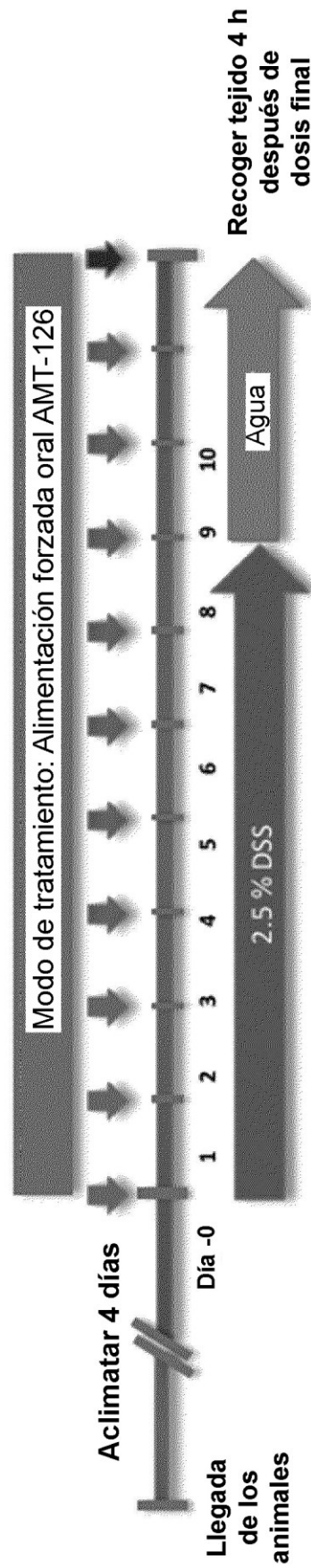


FIG. 7A

Grupo	Vía, frecuencia	Dosis
Sin tratamiento	p.o., q.d.	NA
Vehículo	p.o., q.d.	10 mg/mL SBTI en bicarb
Ciclosporina A (control positivo de modelo)	p.o., q.d.	75 mg/kg
rhIL-22	i.p., q.d.	4 mg/kg
SEQ ID NO: 15	p.o., q.d.	1 mg/kg
SEQ ID NO: 15	p.o., q.d.	30 mg/kg

FIG. 7B

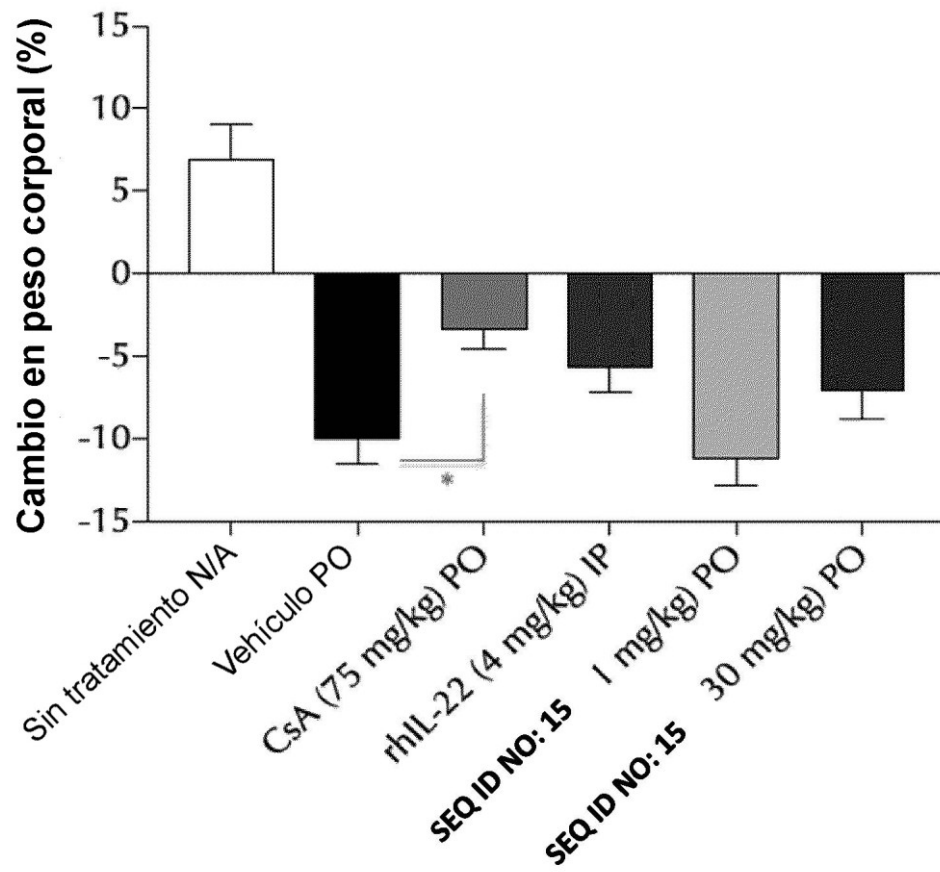
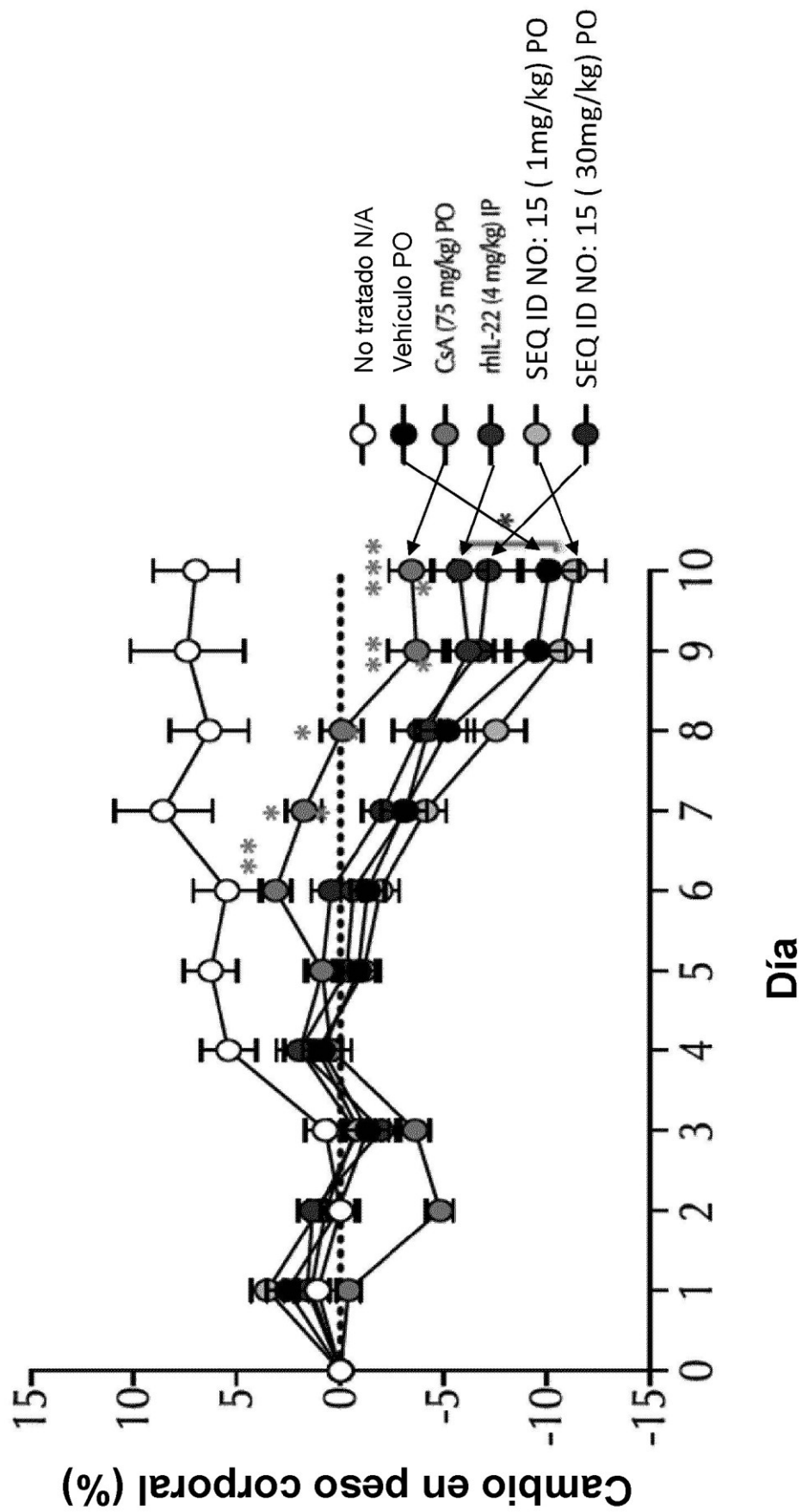


FIG. 8A



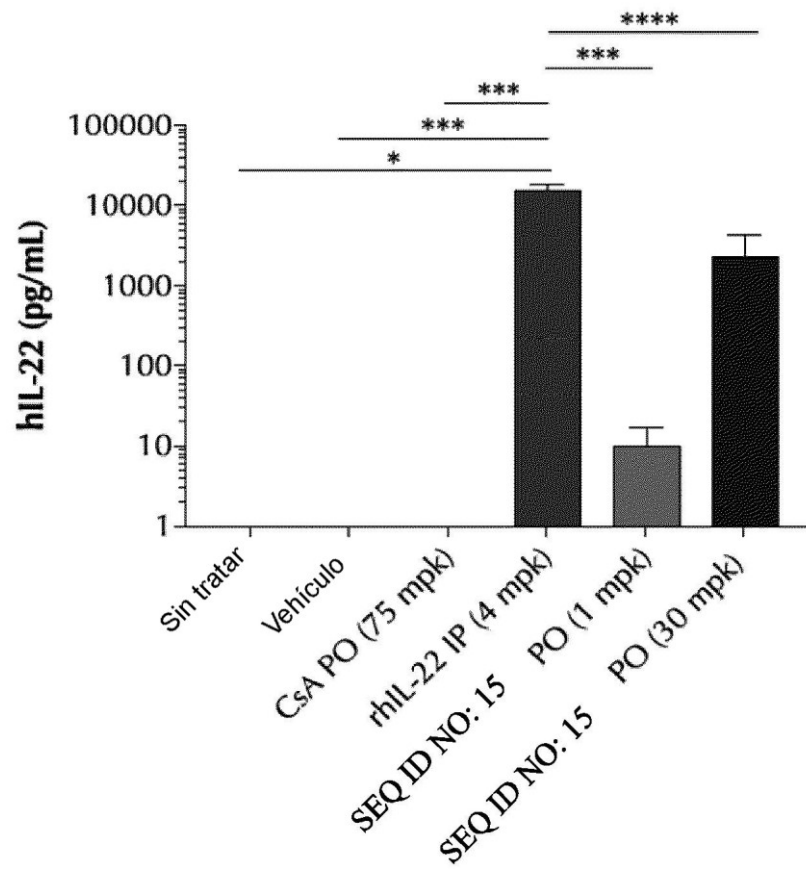


FIG. 9

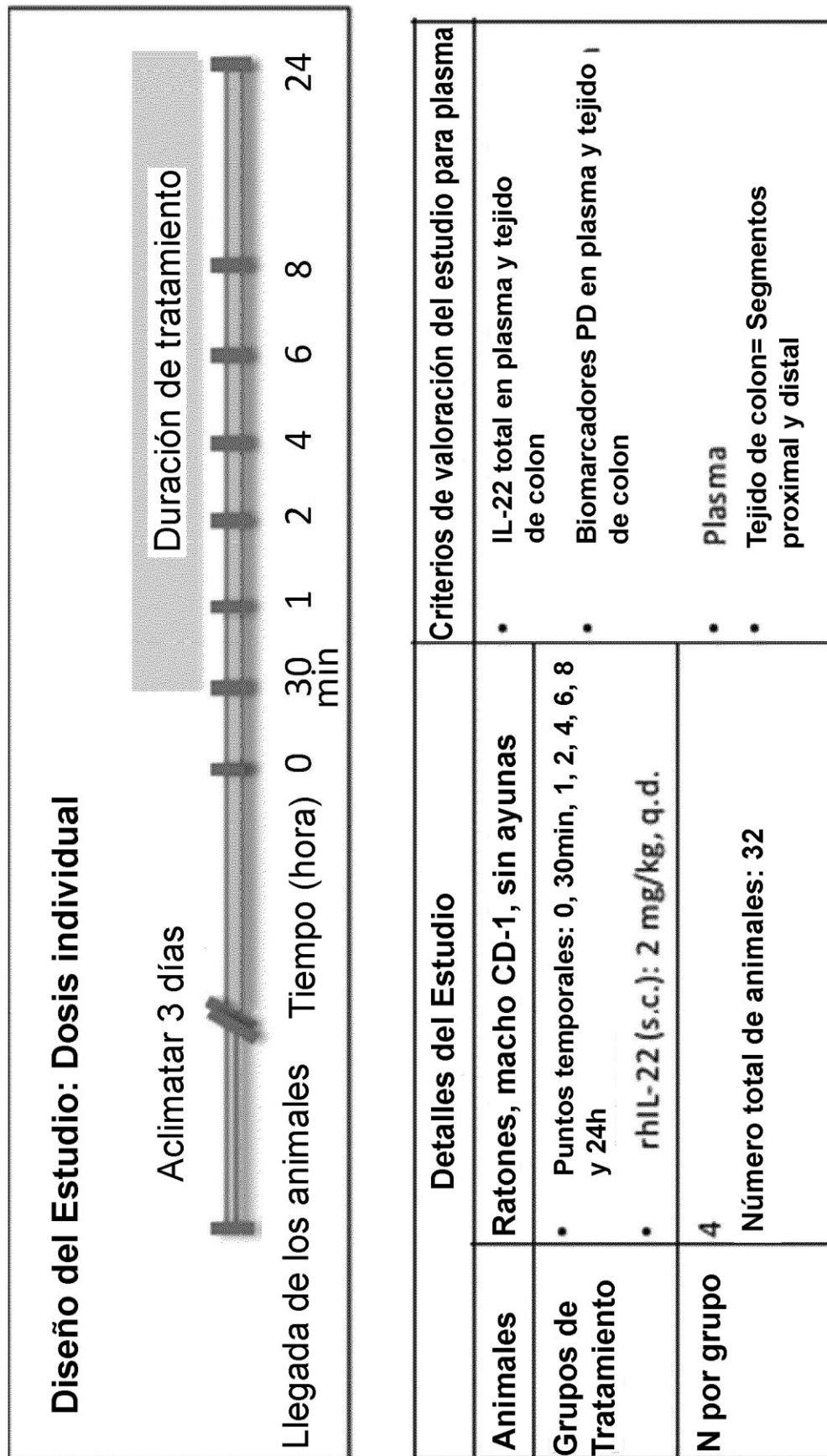


FIG.
10A

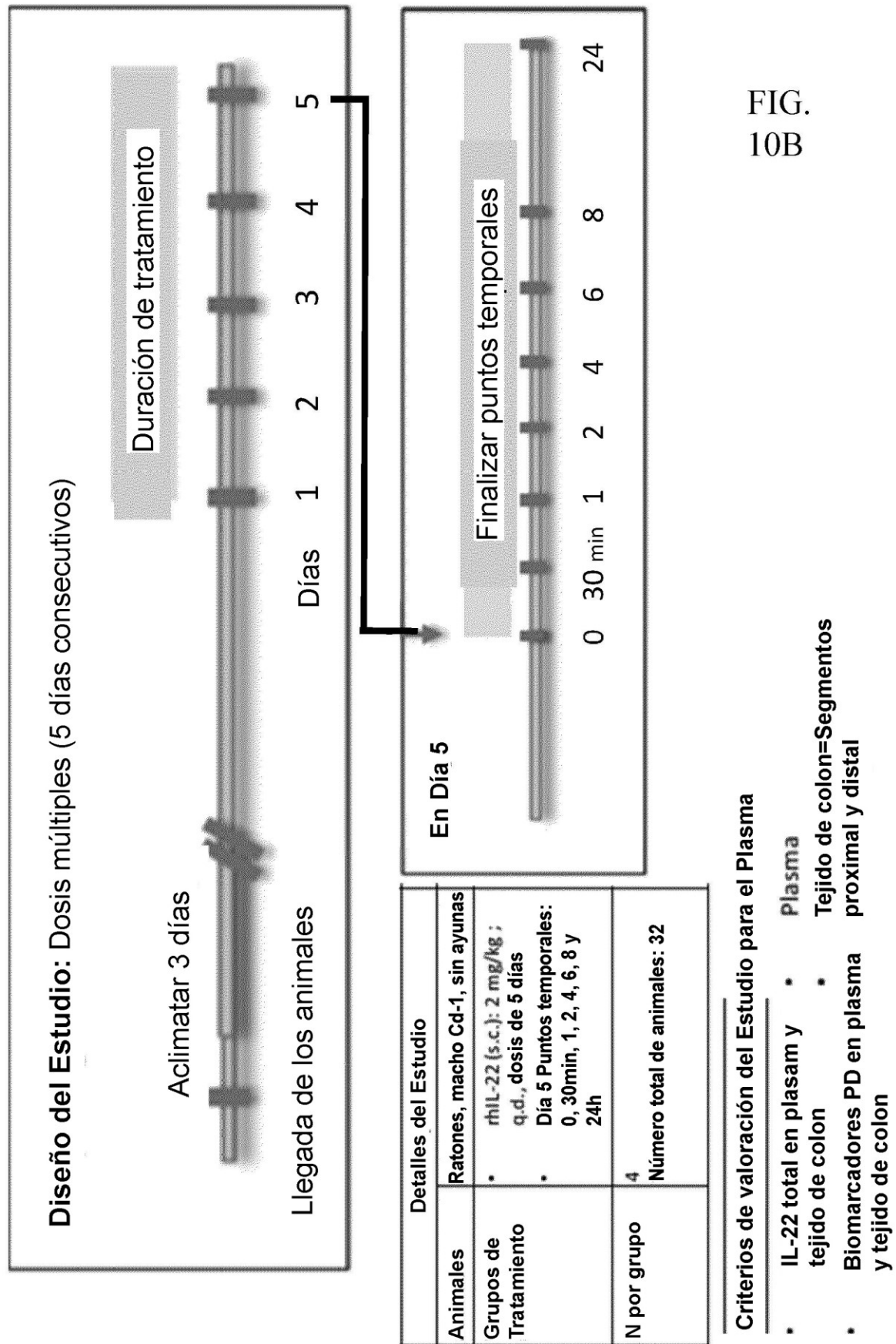


FIG.
10B

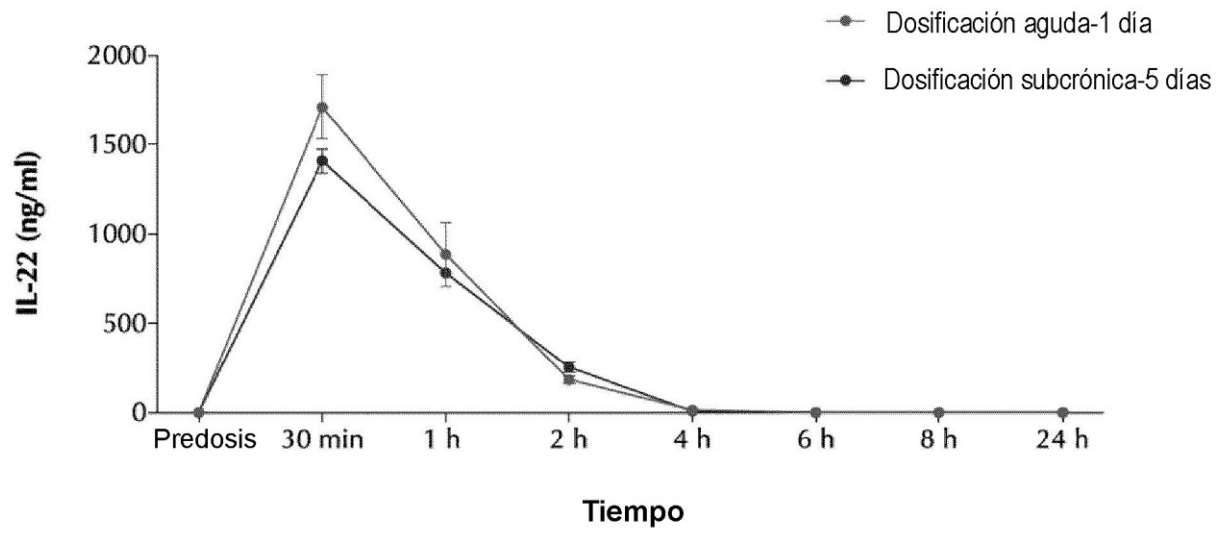


FIG. 11A

Parámetro	Dosificación aguda	Dosificación subcrónica
Cmax	1711 ng/ml	1409 ng/ml
Tmax	30 min	30 min
AUC ₀₋₂₄	2796 (ng/ml)xh	2454 (ng/ml)xh

FIG. 11B

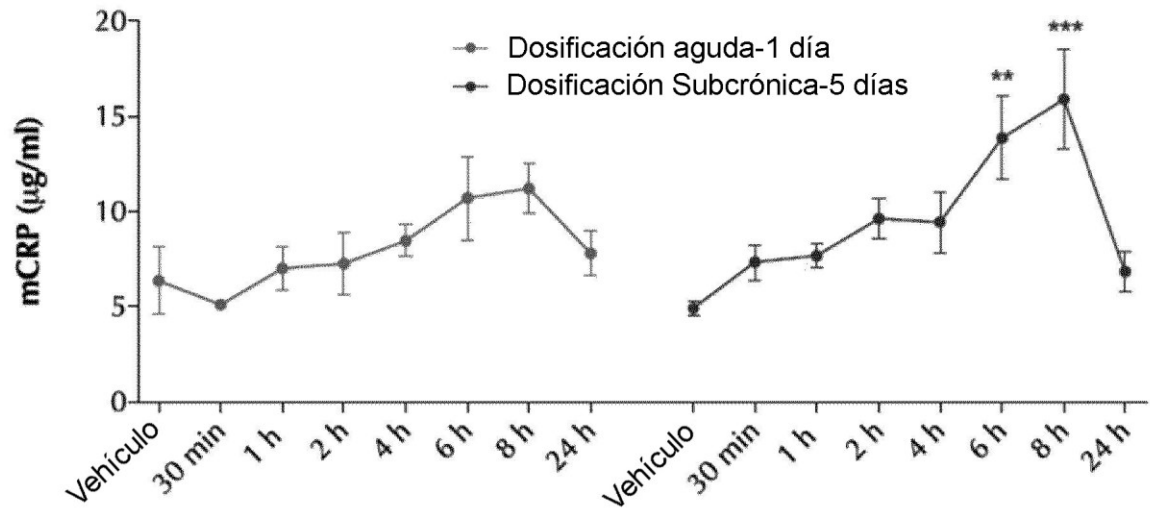


FIG. 12A

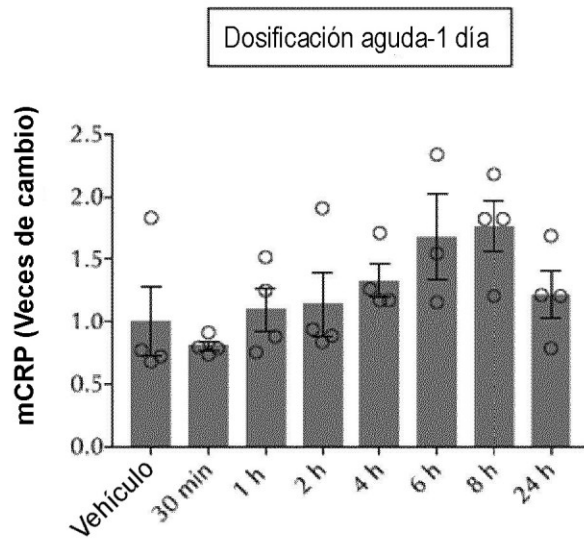


FIG. 12B

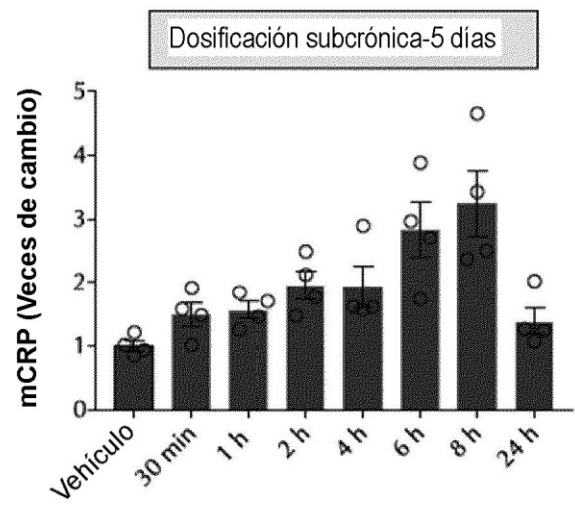


FIG. 12C

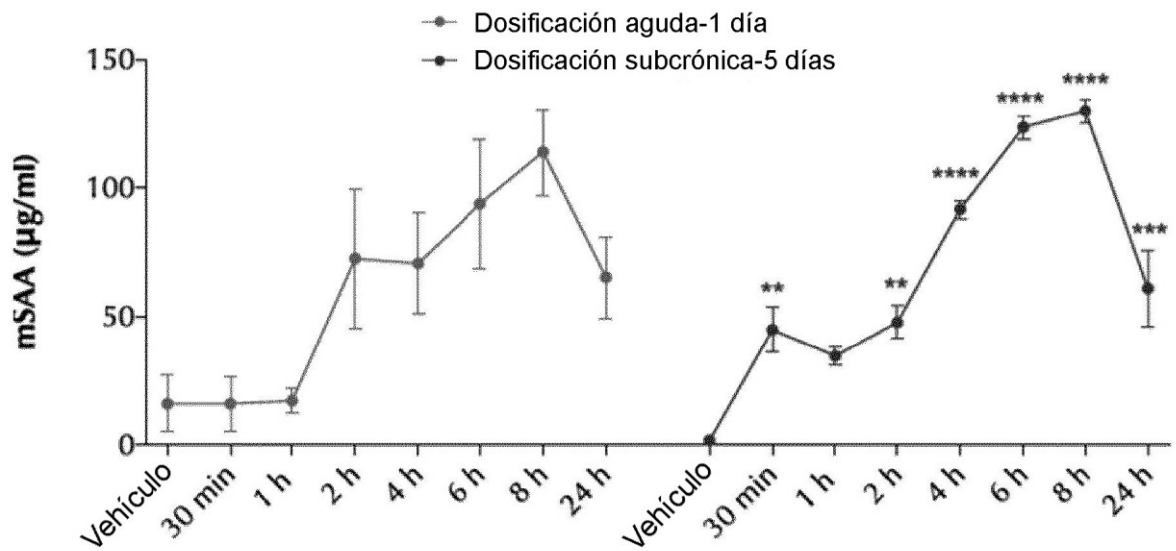


FIG. 13A

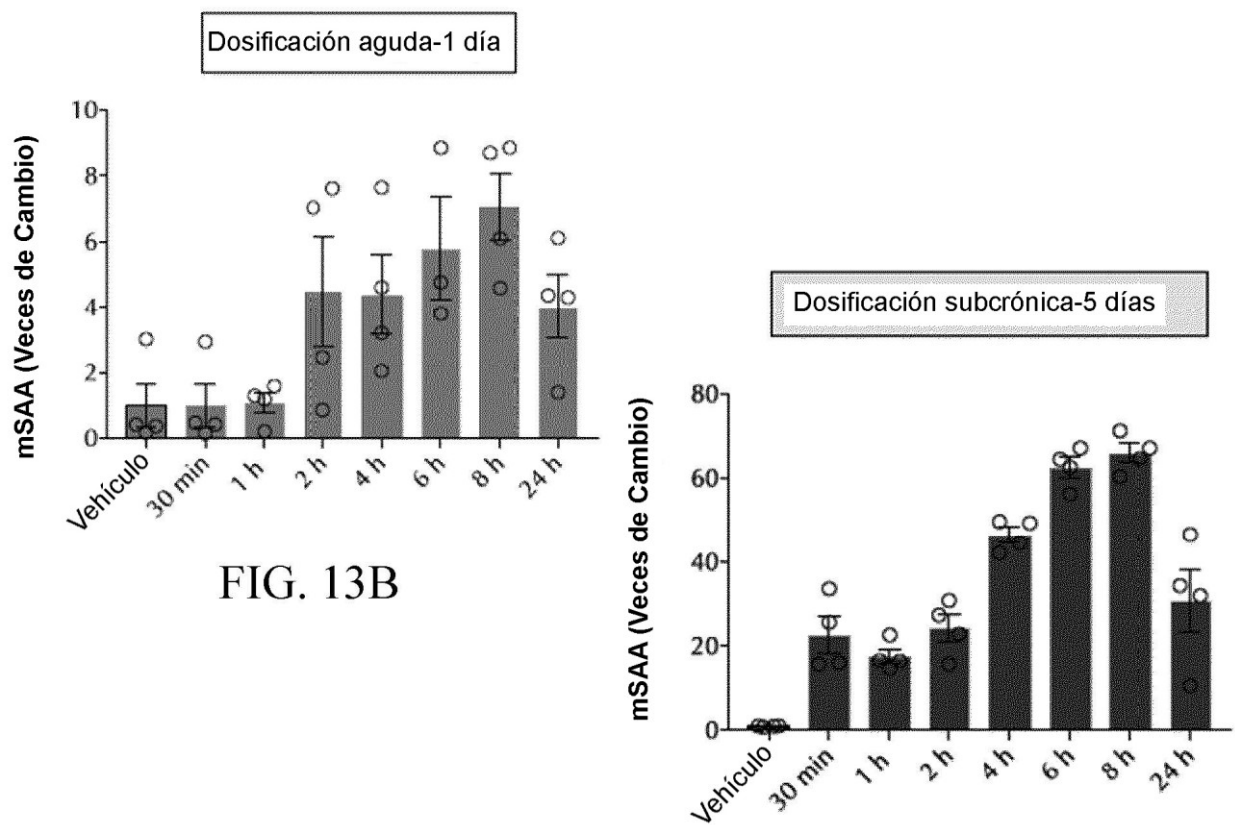


FIG. 13B

FIG. 13C

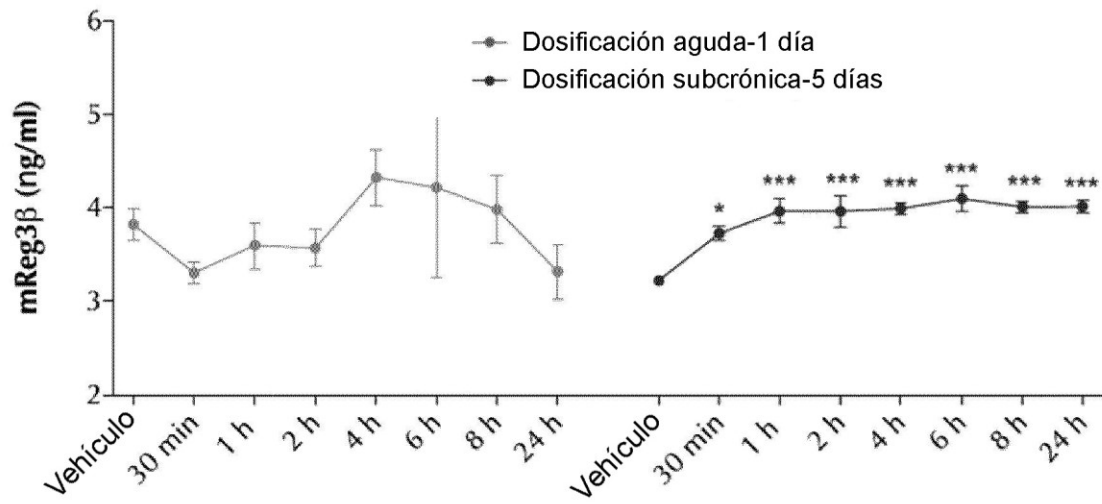


FIG. 14A

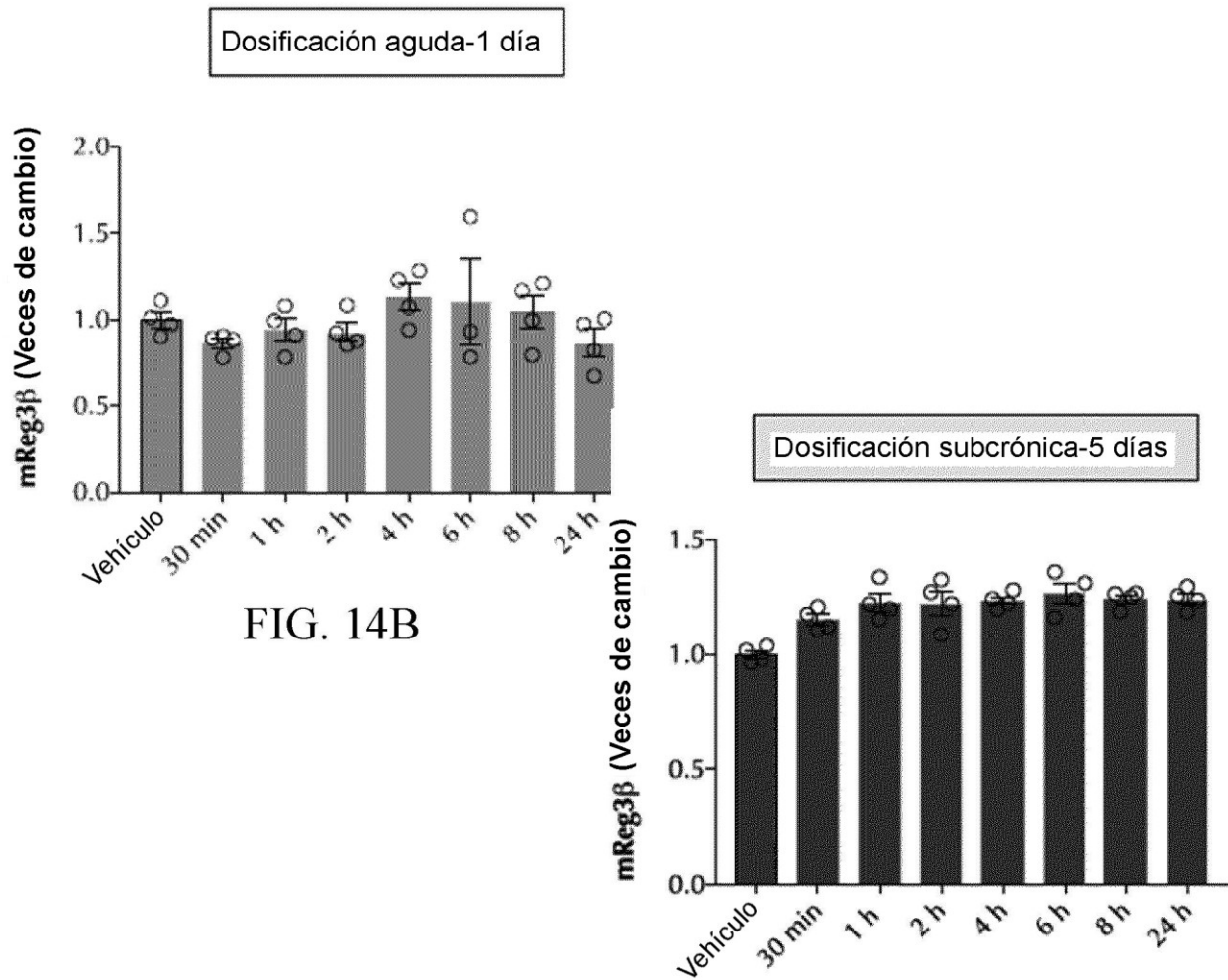


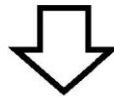
FIG. 14B

FIG. 14C

Características de entrada:

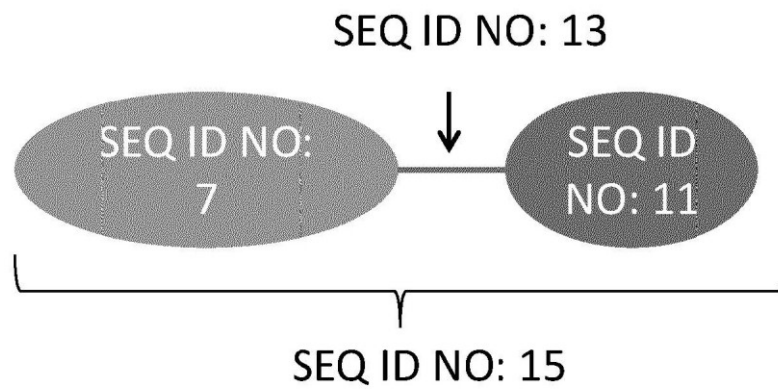
1. Bueno y fal de aislar IB, Replegado eficiente
2. Reducir el volumen de replegado por UFDF
2. Capacidad de unión dinámica alta
3. Resolución alta
4. Operación a caudales altos
5. Presión del sistema baja
6. Ampliar a escala el proceso

FIG.
15



Salida medida:

1. IB aislado con agua, 56% de AMT 126 plegado apropiadamente
2. 10x más pequeño en volumen
2. Rendimiento de producto alto
3. Pureza de producto alta
4. Caudal/presión
5. Proceso ampliable a escala (columna de 5 ml a 4,9 l)
6. Calidad del producto: 1. Activo 2. Estable 3. Endotoxina baja



MW: 48 kDa

pl teórico: 5.5

Enlaces disulfuro: 4

FIG. 16

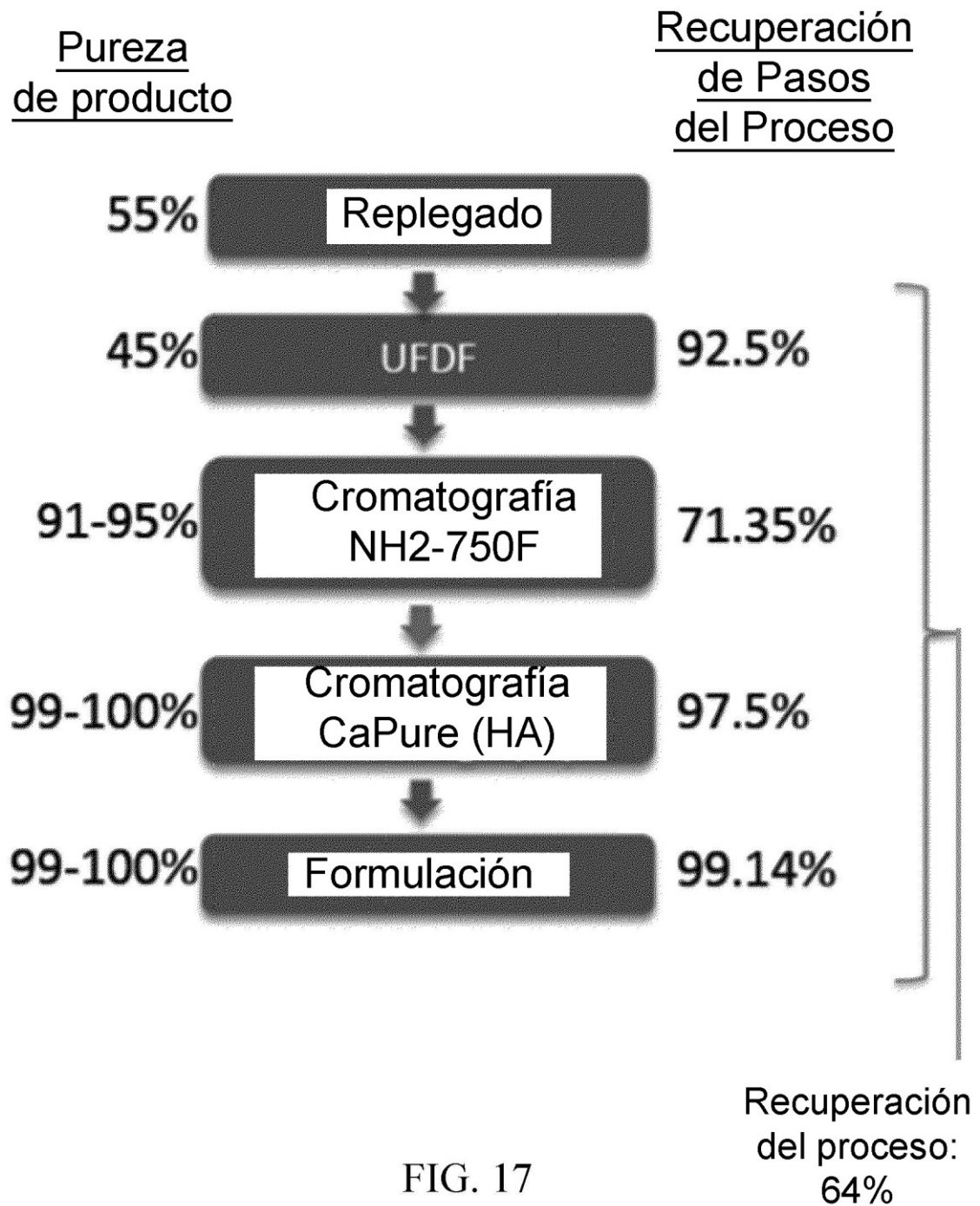


FIG. 17

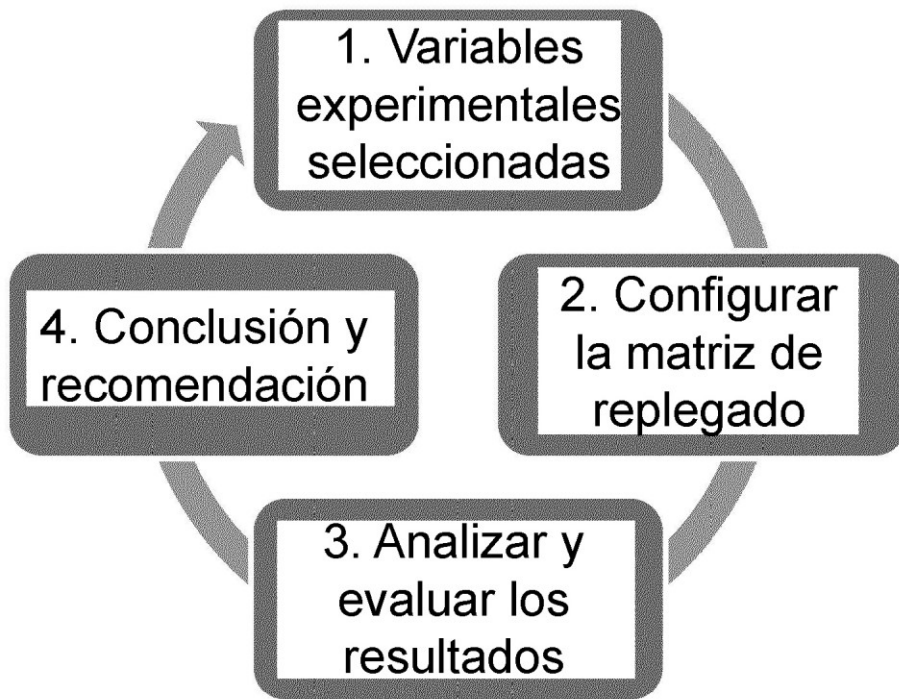


FIG. 18

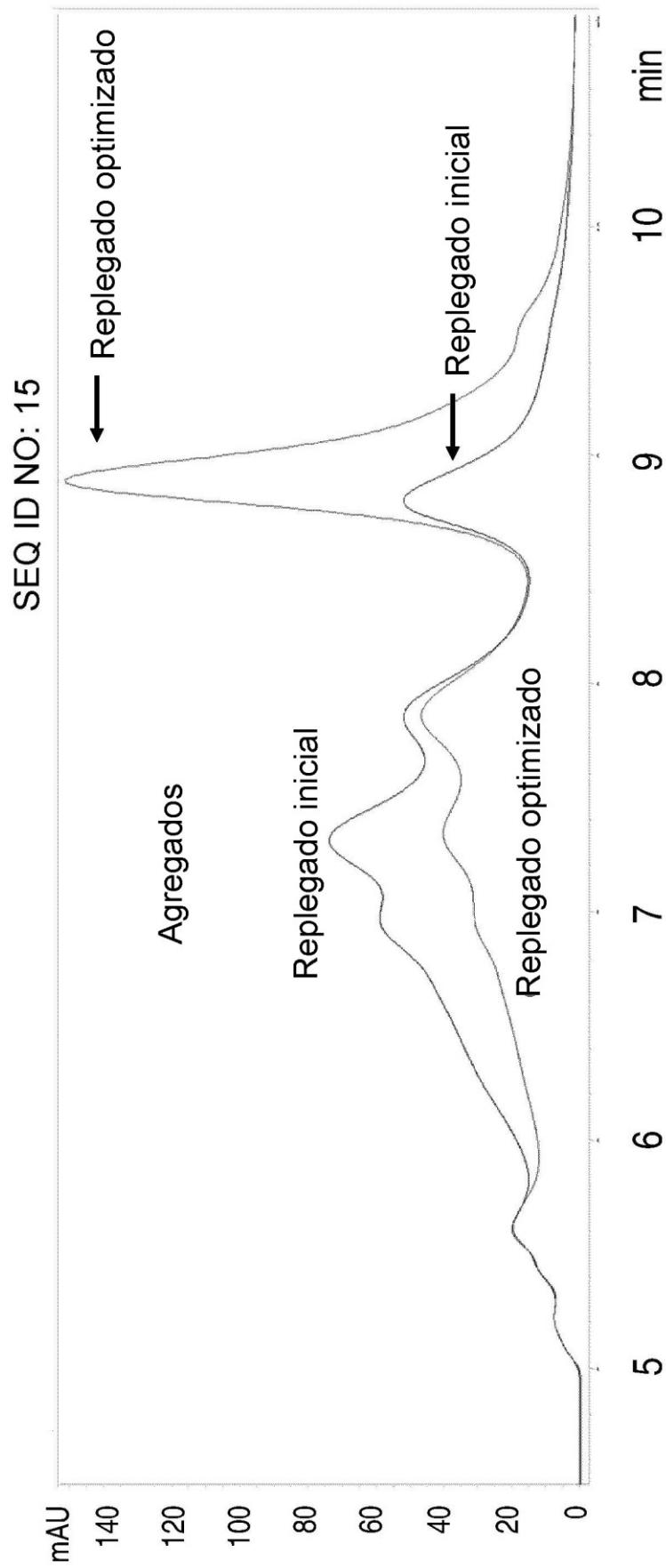


FIG.
19

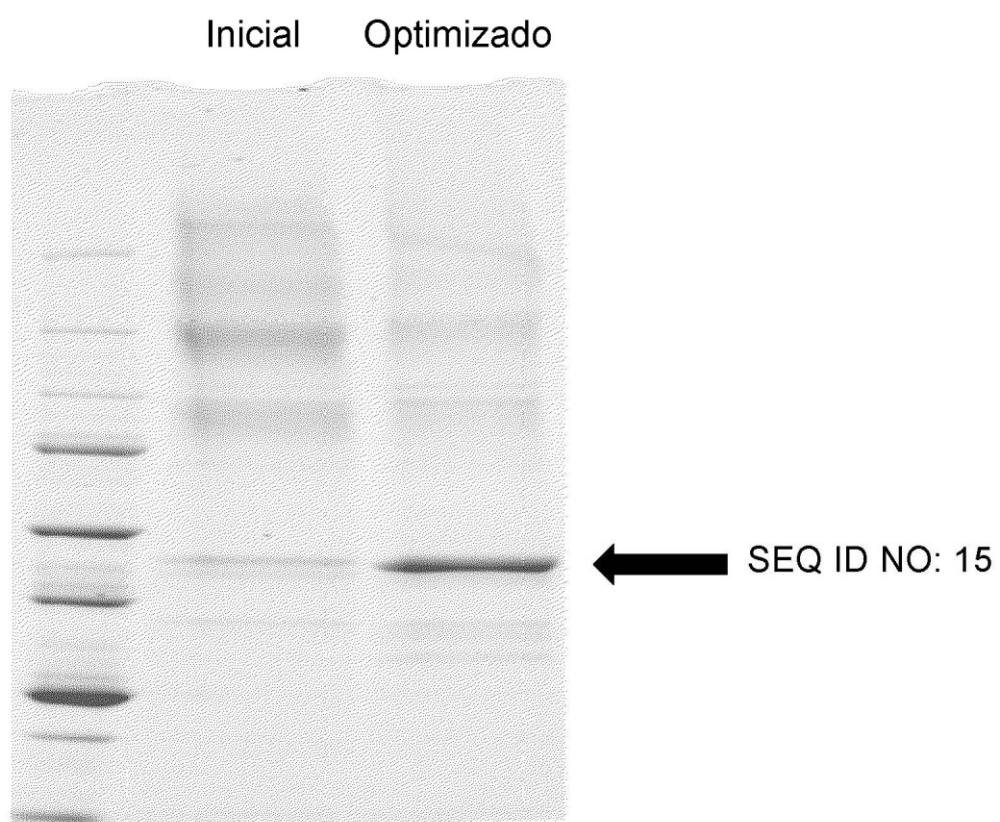


FIG. 20

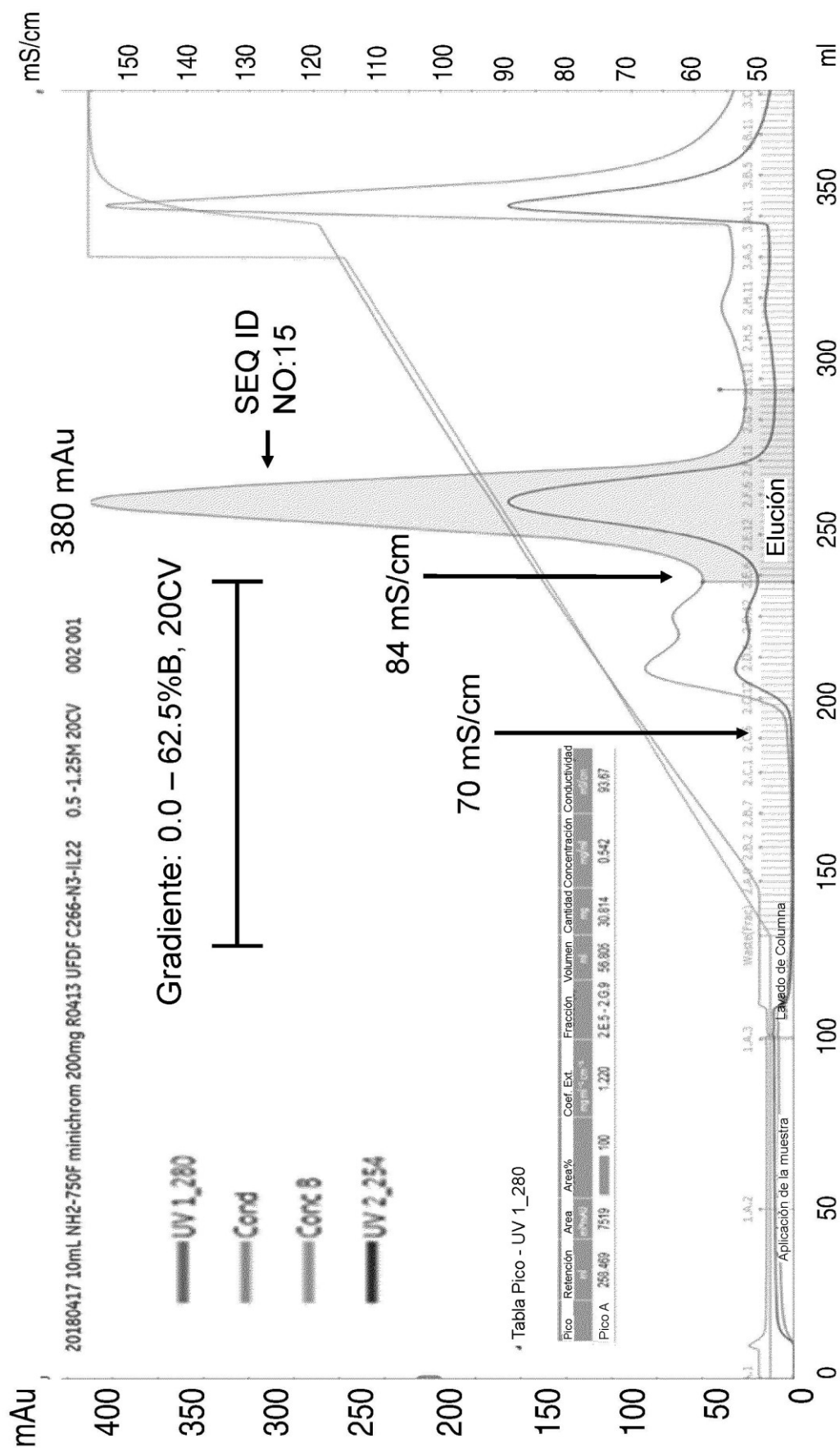
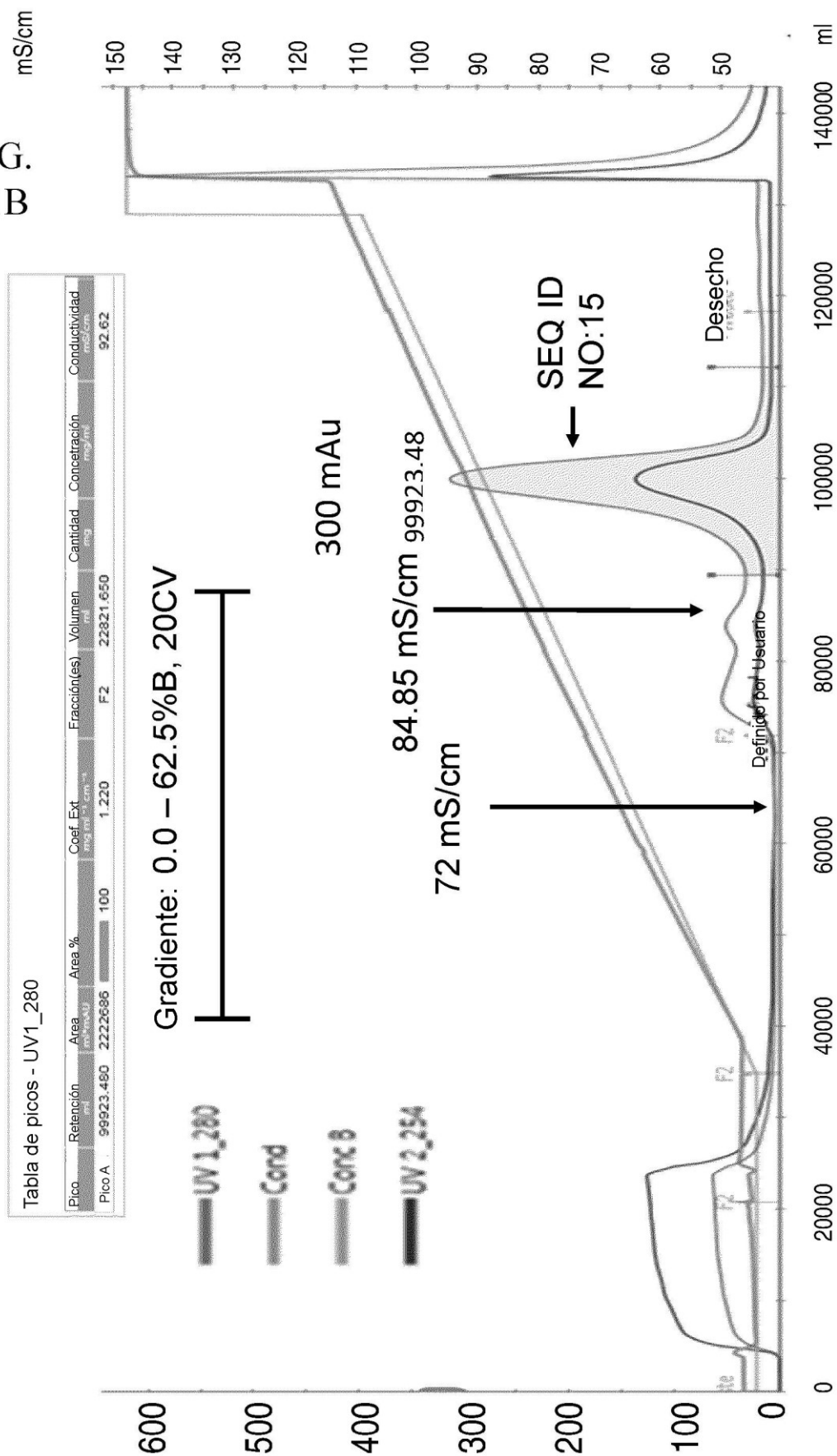
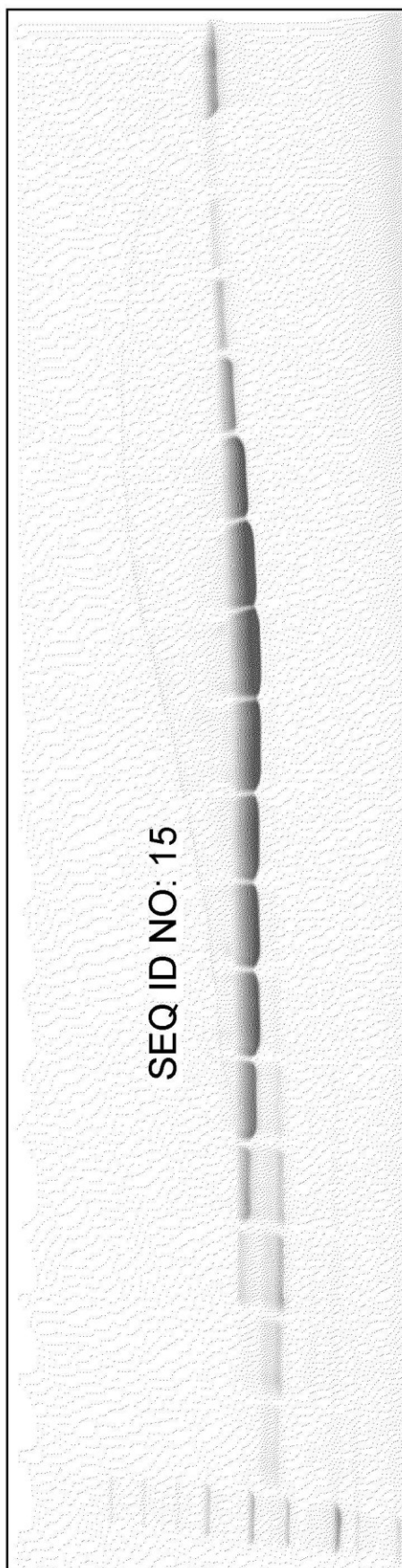


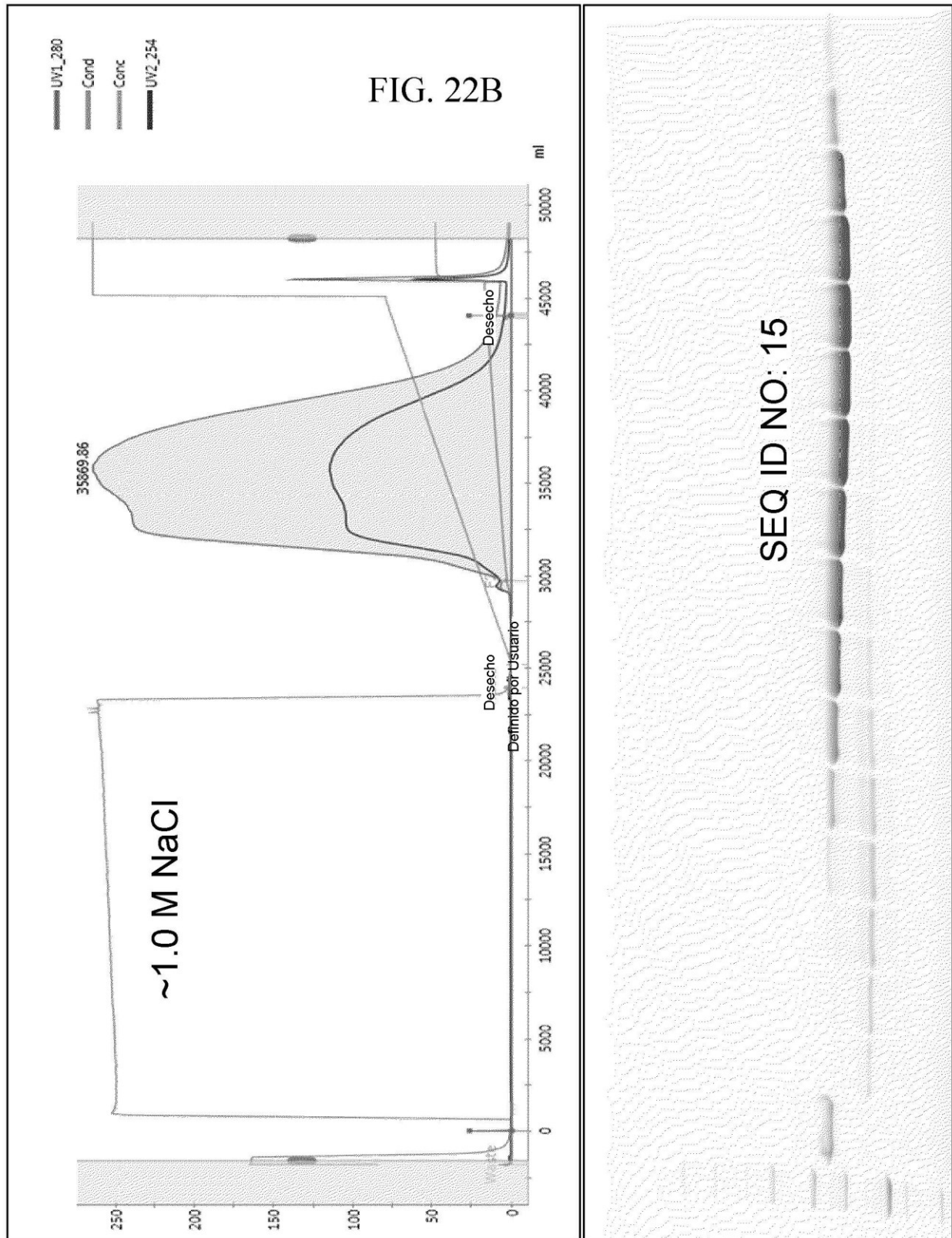
FIG. 21A

20180501 C266N3IL22 en 4.6L NH2750F ES AJS no equil 001

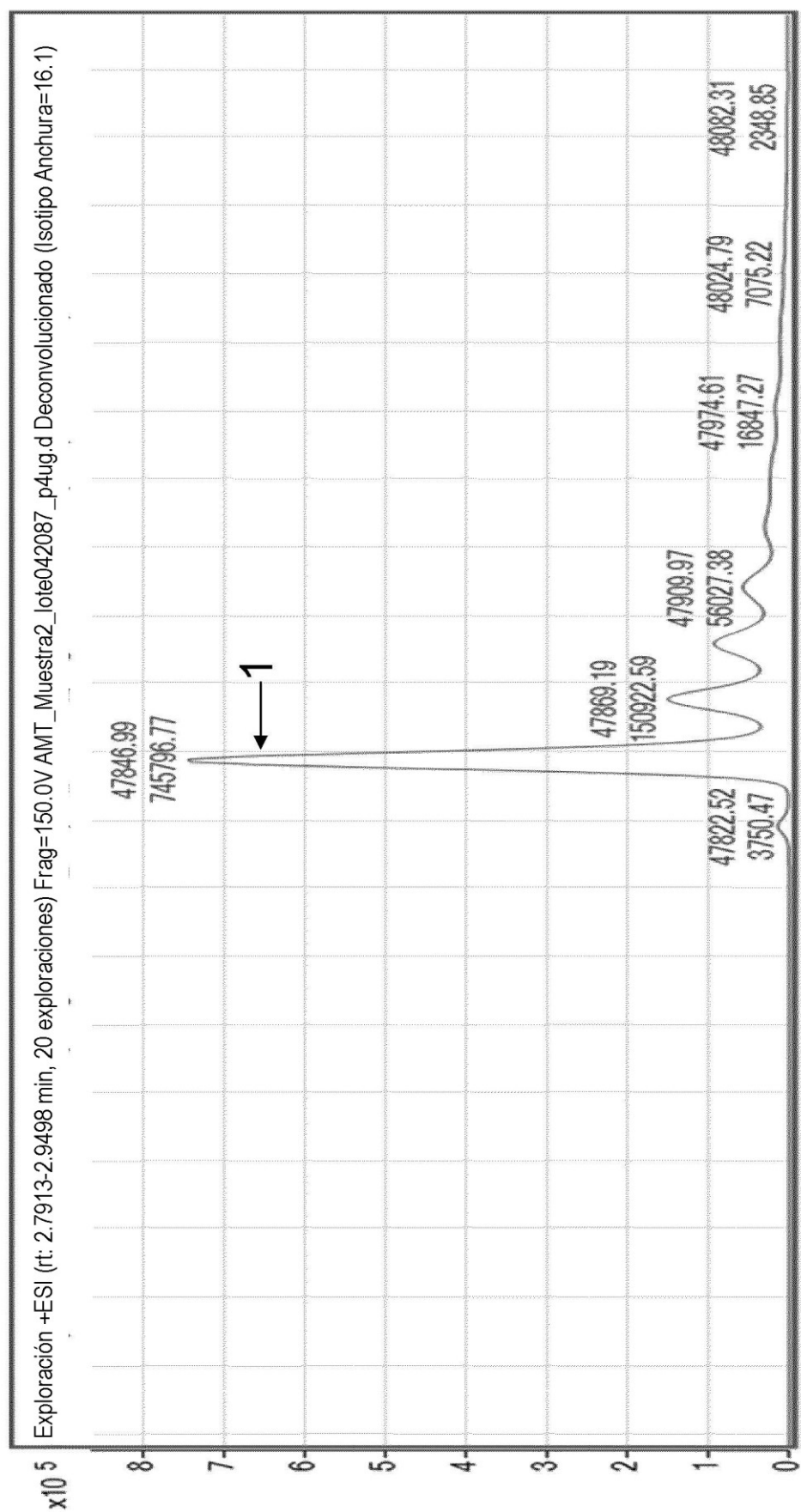
FIG.
21B

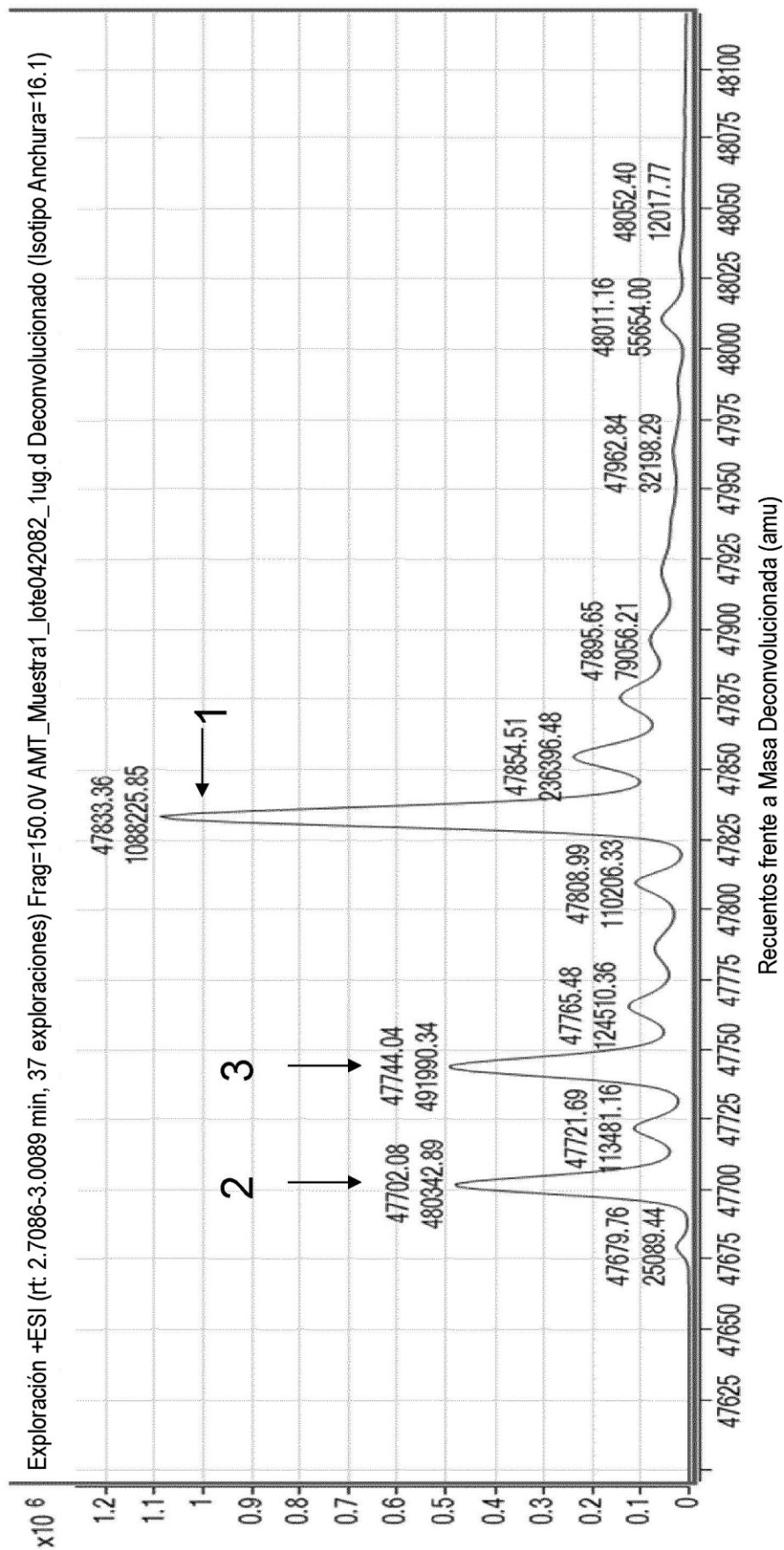






SEQ ID NO: 15

FIG.
23A

FIG.
23B

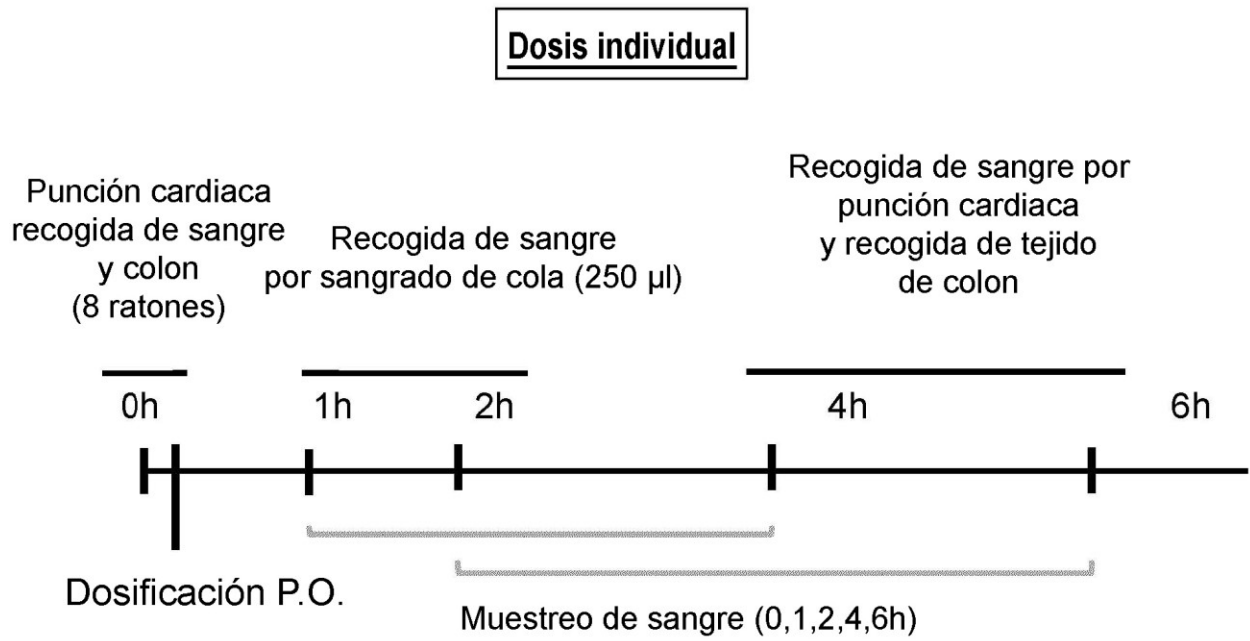


FIG. 24

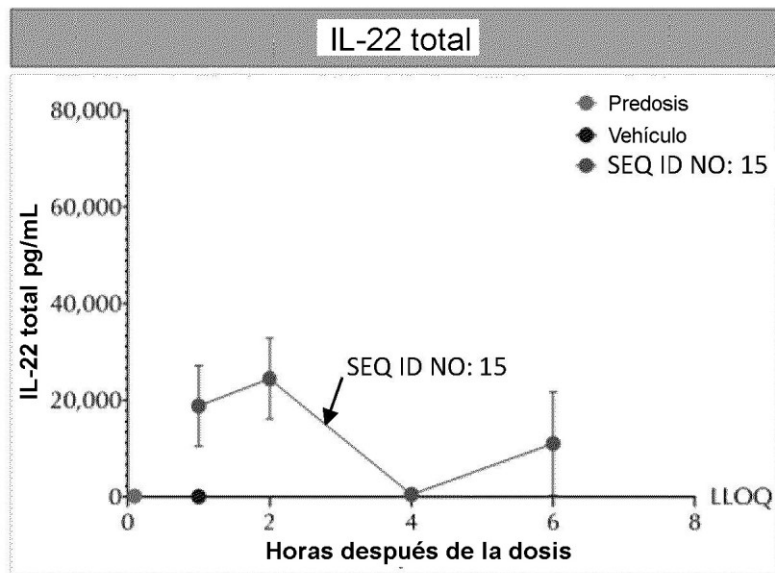


FIG. 25A

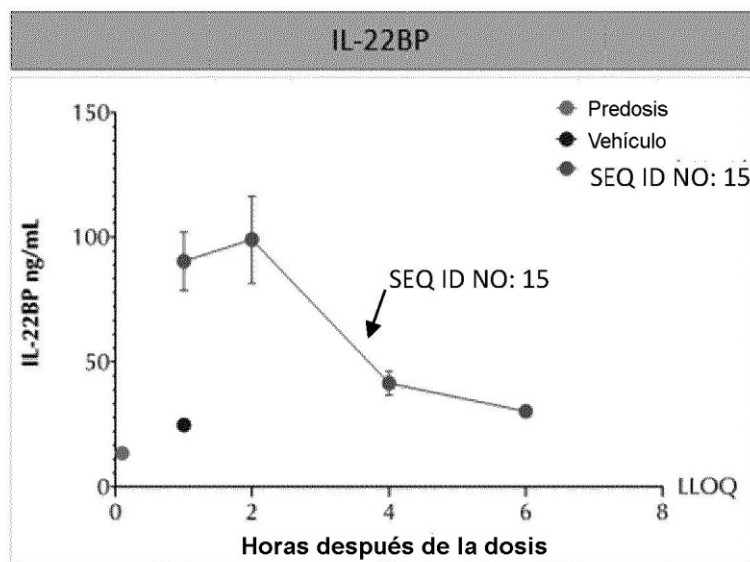


FIG. 25B

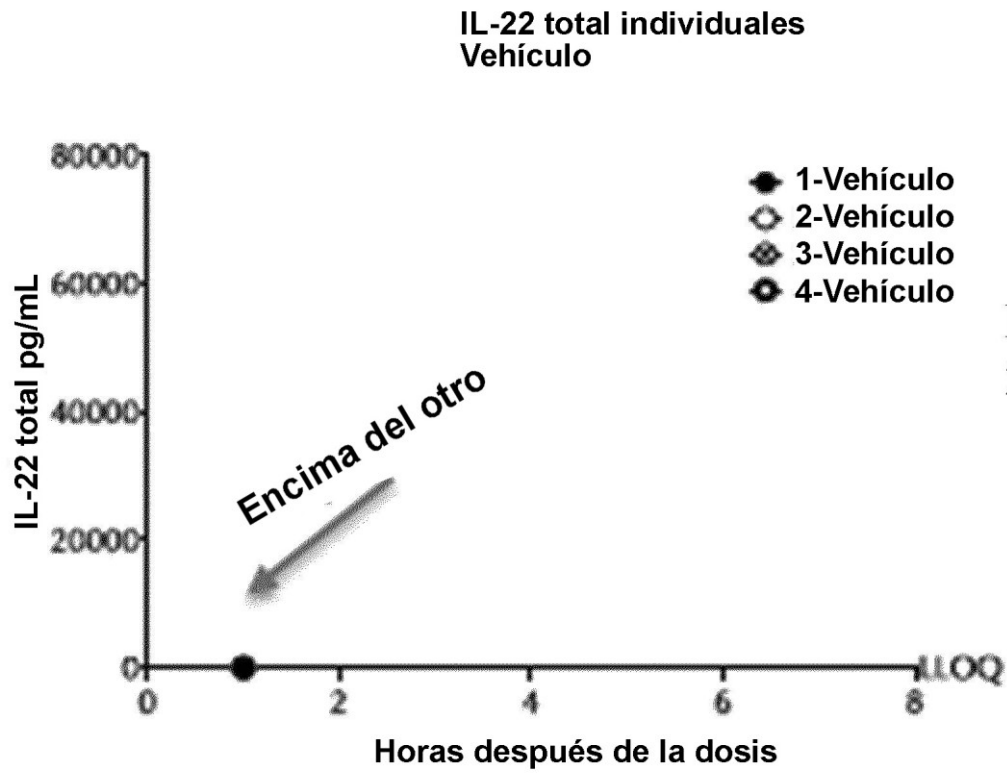


FIG.
26A

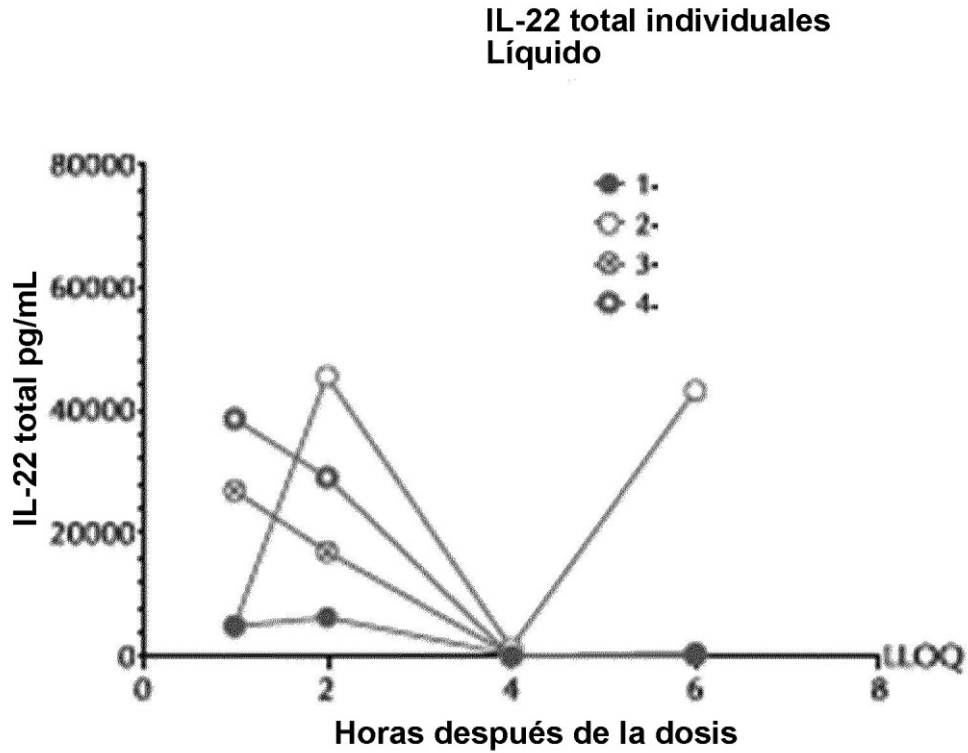
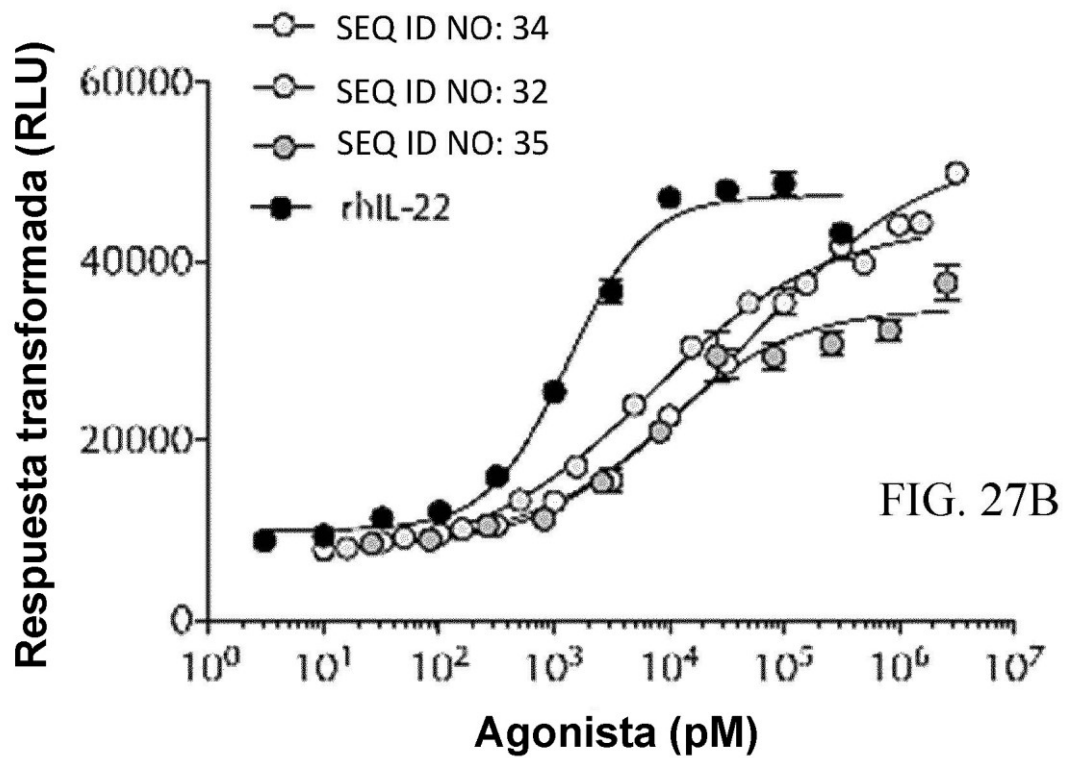
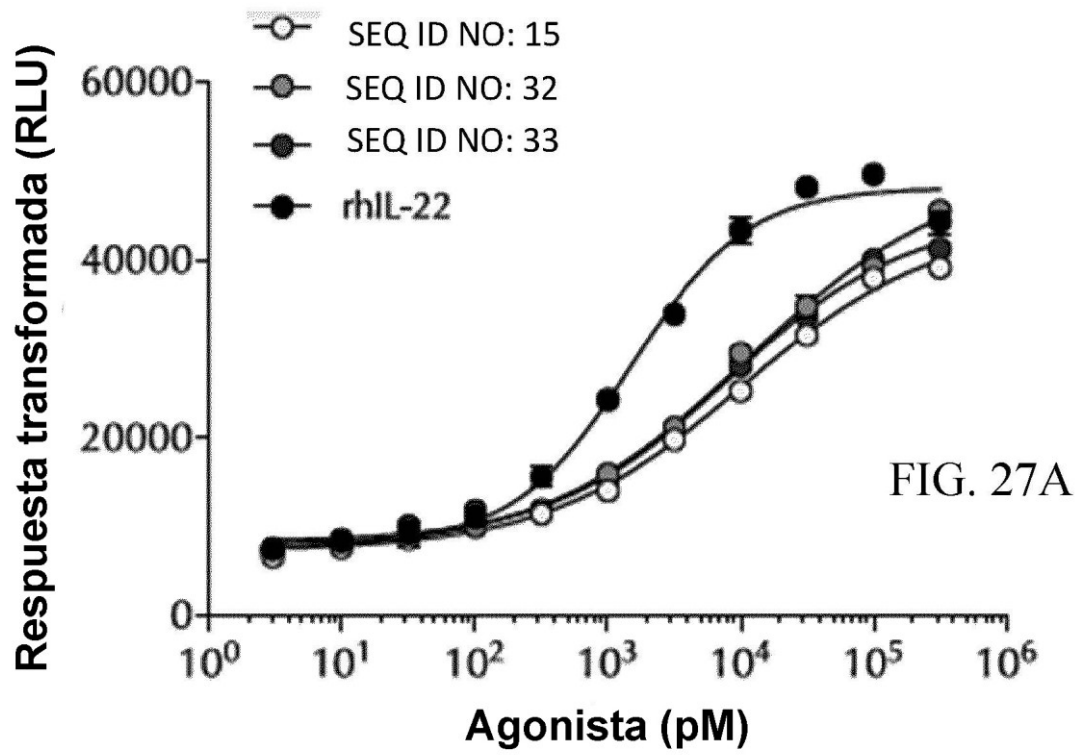


FIG.
26B



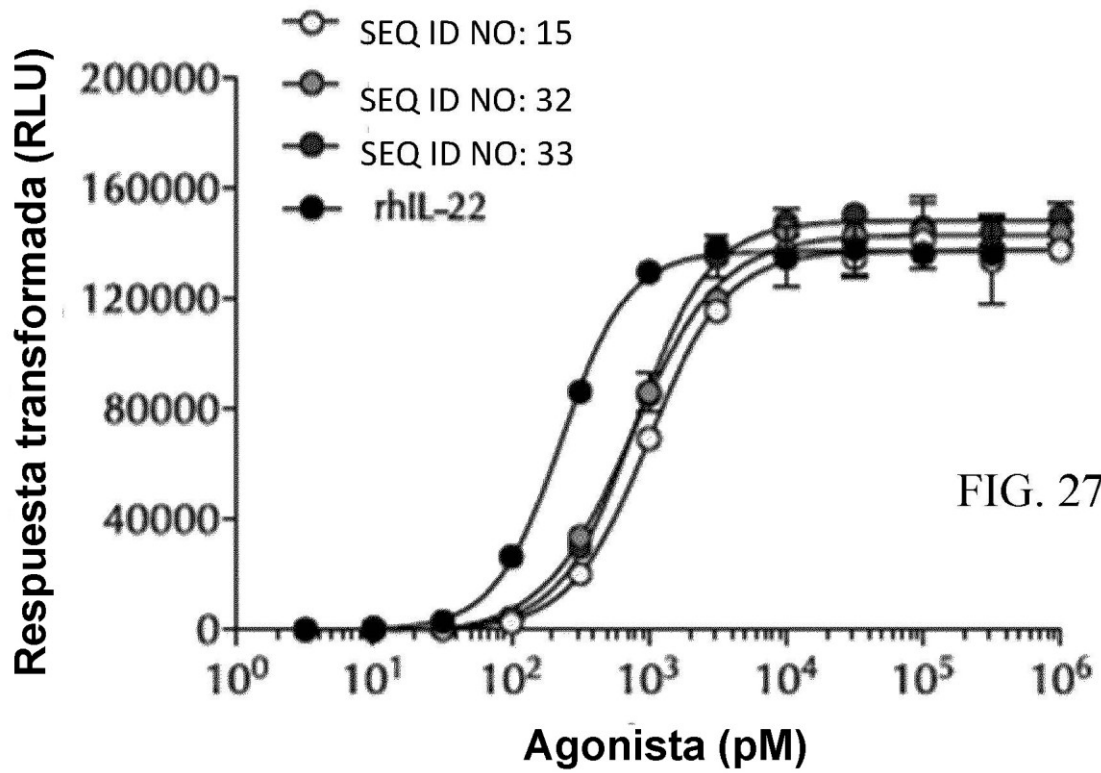


FIG. 27C

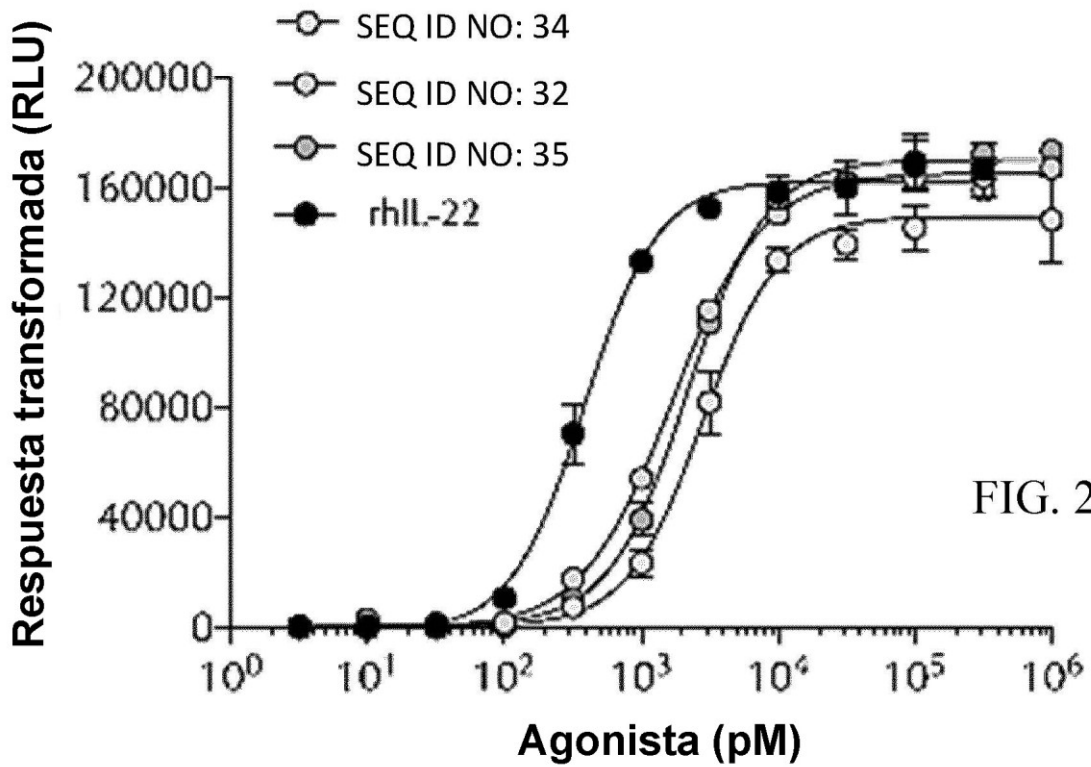


FIG. 27D