

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 900 328**

51 Int. Cl.:

A61K 38/51	(2006.01) A61K 9/00	(2006.01)
A61K 38/50	(2006.01) C07K 14/54	(2006.01)
A61K 38/49	(2006.01) C07K 16/24	(2006.01)
A61K 38/48	(2006.01) A61P 1/00	(2006.01)
A61K 38/26	(2006.01) A61P 1/12	(2006.01)
A61K 38/20	(2006.01) A61P 17/06	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01) A61P 29/00	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01) A61P 31/04	(2006.01)
A61K 38/45	(2006.01) A61P 37/06	(2006.01)
A61K 47/50	(2007.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.05.2015 PCT/US2015/029795**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15171965**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2015 E 15788688 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.09.2021 EP 3139965**

54 Título: **Moléculas de fusión derivadas de toxina Cholix para la administración oral de carga biológicamente activa**

30 Prioridad:

07.05.2014 US 201461990054 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.03.2022

73 Titular/es:

**APPLIED MOLECULAR TRANSPORT INC.
(100.0%)
1 Tower Place, Suite 850
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**MRSNY, RANDALL, J. y
MAHMOOD, TAHIR**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 900 328 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Moléculas de fusión derivadas de toxina Cholix para la administración oral de carga biológicamente activa

5 CAMPO TÉCNICO

La administración oral de polipéptidos biológicamente activos (en referencia a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos; típicamente también definidos como proteínas o péptidos) ha sido un objetivo desde hace mucho tiempo de la industria farmacéutica. Desafortunadamente, las numerosas barreras físicas, fisiológicas y biológicas del tracto gastrointestinal (GI) están diseñadas para inhibir la captación de proteínas y péptidos hasta que puedan degradarse lo suficiente para la absorción a través de transportadores de aminoácidos y di- o tripéptidos; y/o para transportar las proteínas y péptidos intracelularmente a compartimentos de lisosomas destructivos después de la captación endosómica en la superficie luminal. Como tal, la viabilidad de la captación de polipéptidos del intestino de una manera similar a la que puede lograrse con, por ejemplo, moléculas pequeñas, se ha limitado y la baja biodisponibilidad oral continúa siendo un problema para la mayoría de polipéptidos y proteínas.

Si bien ha habido algunos resultados prometedores de estudios clínicos que evalúan varios polipéptidos biológicamente activos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, enfermedades inflamatorias, enfermedades inmunes, trastornos por deficiencia del crecimiento, etc., y la FDA ha aprobado varios agentes terapéuticos basados en ADN para tales usos, estos agentes terapéuticos a menudo no alcanzan realmente su potencial óptimo, ya que a menudo hay una eficacia general marginal o inadecuada debido a limitaciones inherentes, como una vida media biológica corta que impide la administración de dosificaciones óptimas terapéuticamente efectivas y/o efectos secundarios y toxicidades perjudiciales observados a las dosis terapéuticamente eficaces. Además, muchos de estos agentes terapéuticos requieren múltiples regímenes de dosificación, lo que requiere una administración continua por vía intravenosa o mediante frecuentes inyecciones subcutáneas, que son molestos para los pacientes y para los proveedores de cuidados.

Los estudios clínicos futuros dirigidos a evaluar los polipéptidos biológicamente activos prometedores podrían beneficiarse enormemente de nuevos métodos y/o composiciones farmacéuticas que podrían usarse para administrar por vía oral tales polipéptidos a un sujeto humano. La WO2012101235 divulga un sistema de administración y conjugados para la administración de compuestos a través de vías de transporte intracelular de origen natural. La WO2012110596 divulga una proteína de fusión para el tratamiento de reacciones inmunológicas o alérgicas. La WO2009014650 divulga exotoxinas recombinantes de vibrio cholerae. La WO2010040105 divulga proteínas de unión a múltiples objetivos antagonistas de CD86. Bublin *et al.* analiza el uso de una subunidad/molécula de fusión de alérgeno genética de la toxina del cólera B como sistema de administración a la mucosa con actividad inmunosupresora contra las respuestas inmunitarias de Th2. La US20130172229 divulga sistemas y métodos de administración de agentes bioactivos que usan secuencias de transporte derivadas de toxinas bacterianas. La US20110250199 divulga inmunotoxinas y usos de las mismas. La US20030186386 divulga conjugados de interleucina 10. La US20090148401 divulga métodos y composiciones para la administración sin agujas de compañeros de unión.

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de fusión de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulados para administración oral a un sujeto, en donde la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a una IL-10, en donde la toxina de Cholix no es tóxica, y en donde la molécula de fusión tiene una capacidad para activar un receptor para IL-10; en donde la toxina de Cholix modificada está truncada en un residuo de aminoácidos dentro del dominio II de la toxina de Cholix; y en donde la IL-10 es interleucina-10 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82 o un fragmento o variante de la misma, en donde el fragmento o variante contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de por lo menos aproximadamente el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

La presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden nuevas moléculas de fusión de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulados para administración oral y diseñados para proporcionar terapias eficaces mejoradas para el tratamiento de, por ejemplo, enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes, enfermedades y/o cánceres.

La presente divulgación se basa en parte en la visión única de los inventores de que la administración oral de una composición farmacéutica que comprende una molécula de fusión que comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a una carga biológicamente activa puede, entre otras cosas, proporcionar las siguientes ventajas: a) en realizaciones en donde la toxina de Cholix modificada se acopla a la carga biológicamente activa sin un conector, o con un conector no escindible, el efecto de anclaje de la toxina de Cholix modificada por su receptor o receptores en la superficie de, por ejemplo, células inmunitarias que también expresan el receptor para la carga biológicamente activa, puede permitir una mayor exposición de la carga biológicamente activa en la superficie de las

células objetivo y proporcionar un efecto sinérgico al unirse a tanto al receptor de Cholix como al receptor de carga biológicamente activo; b) en realizaciones en las que la toxina de Cholix modificada se acopla a la carga biológicamente activa con un conector que es escindible por una enzima presente en una membrana basolateral de una célula epitelial, o una enzima presente en el plasma del sujeto, dicha escisión permitirá que la carga biológicamente activa se libere del resto de la molécula de fusión poco después de la transcitosis a través de la membrana epitelial c) la administración directa de la carga biológicamente activa al espacio submucoso-GI y al sistema hepático-portal puede reducir la toxicidad sistémica observada cuando la carga se administra por vía parenteral, además de permitir el acceso a la biología objetivo submucosal a la que era difícil apuntar a través de vías no orales o GI; d) una vez transportadas a través del epitelio GI, las moléculas de fusión de la divulgación mostrarán una vida media extendida en suero, es decir, la carga biológicamente activa de las moléculas de fusión mostrará una vida media en suero prolongada en comparación con la carga biológicamente activa en su estado no fusionado; e) la administración oral de la molécula de fusión puede administrar una concentración eficaz más alta de la carga biológicamente activa administrada al hígado del sujeto que la observada en el plasma del sujeto; y f) la capacidad de administrar la carga biológicamente activa a un sujeto sin usar una aguja para perforar la piel del sujeto, mejorando de este modo la calidad de vida de dichos sujetos al evitar el dolor o las posibles complicaciones asociadas con la misma, además una conveniencia y cumplimiento paciente/proveedor de atención médica mejorada.

Por tanto, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de fusión de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulados para administración oral, en donde la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a una carga biológicamente activa para ser administrada a un sujeto, en donde la toxina de Cholix no es tóxica.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de fusión de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulados para administración oral, en donde la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a una carga biológicamente activa que se administrará a un sujeto, en donde la toxina de Cholix no es tóxica y en donde la molécula de fusión tiene la capacidad de activar el receptor para la carga biológicamente activa, o de permitir el proceso catalítico de un material catalíticamente activo.

En varias realizaciones, las moléculas de fusión de las composiciones farmacéuticas comprenden una toxina de Cholix modificada truncada en un residuo de aminoácidos dentro del dominio II de la toxina de Cholix. En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix truncada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en, por ejemplo, la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 o SEQ ID NO: 41.

En varias realizaciones, las moléculas de fusión de las composiciones farmacéuticas comprenden una toxina de Cholix modificada truncada en un residuo de aminoácidos dentro del dominio Ib de la toxina de Cholix. En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix truncada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en, por ejemplo, la SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, o SEQ ID NO: 80.

En varias realizaciones, las moléculas de fusión de las composiciones farmacéuticas comprenden una toxina de Cholix modificada en donde el dominio III se ha truncado o mutado. En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix mutada que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 81 en donde se ha eliminado el residuo de aminoácidos E581 de la SEQ ID NO: 1 (designado en la presente como "Cholix ΔE581").

En varias realizaciones, las moléculas de fusión de las composiciones farmacéuticas comprenden una toxina de Cholix modificada en la que se ha mutado el dominio Ia.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa se selecciona de, por ejemplo, una macromolécula, molécula pequeña, péptido, polipéptido, ácido nucleico, ARNm, miARN, ARNh_c, ARNi_p, molécula antisentido, anticuerpo, ADN, plásmido, vacuna, nanopartícula polimérica o material catalíticamente-activo.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es una enzima seleccionada de hialuronidasa,

estreptoquinasa, activador del plasminógeno tisular, uroquinasa o PGE-adenosina desaminasa.

5 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un polipéptido que es un modulador de la inflamación en el tracto GI seleccionado de, por ejemplo, interleucina-10, interleucina-19, interleucina-20, interleucina-22, interleucina-24 o interleucina-26. En varias realizaciones, el polipéptido biológicamente activo es interleucina-10 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82. En varias realizaciones, el polipéptido biológicamente activo es interleucina-19 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 83. En varias realizaciones, el polipéptido biológicamente activo es interleucina-20 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 84. En varias realizaciones, el polipéptido biológicamente activo es interleucina-22 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID. NO: 85. En varias realizaciones, el polipéptido biológicamente activo es interleucina-24 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 86. En varias realizaciones, el polipéptido biológicamente activo es interleucina-26 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 87. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un modulador de la inflamación en el tracto GI que es una molécula pequeña. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un modulador de la inflamación en el tracto GI que es una molécula antisentido o de ARNip.

20 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un inhibidor de TNFSF que es un anticuerpo, o un fragmento del mismo, o un constructo artificial que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, o un constructo artificial diseñado para imitar la unión de un anticuerpo o fragmento del mismo a su antígeno. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un inhibidor de TNFSF que es una proteína de fusión del receptor de TNFSF soluble. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un inhibidor de TNFSF que es una molécula pequeña. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un inhibidor de TNFSF que es una molécula antisentido o de ARNip.

25 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 88 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 89. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 90 y las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera expuestas en la SEQ ID NO: 91. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un dímero de proteína de fusión del receptor de TNFSF soluble que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 92.

35 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden nuevas moléculas de fusión de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulados para administración oral y diseñados para proporcionar terapias eficaces mejoradas para el tratamiento de trastornos metabólicos, por ejemplo, diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2. La administración oral de polipéptidos biológicamente activos (en referencia a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos; típicamente también definidos como proteínas o péptidos) ha sido un objetivo desde hace mucho tiempo de la industria farmacéutica. Desafortunadamente, las numerosas barreras físicas, fisiológicas y biológicas del tracto gastrointestinal (GI) están diseñadas para inhibir la captación de proteínas y péptidos hasta que puedan degradarse lo suficiente para la absorción a través de transportadores de aminoácidos y di- o tripéptidos; y/o para transportar las proteínas y péptidos intracelularmente a compartimentos de lisosomas destructivos después de la captación endosómica en la superficie luminal. Como tal, la viabilidad de la captación de polipéptidos desde el intestino de una manera similar a la que puede lograrse con, por ejemplo, moléculas pequeñas, ha sido limitada y la baja biodisponibilidad oral sigue siendo un problema para la mayoría de polipéptidos y proteínas.

50 En varias realizaciones, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de fusión de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulados para administración oral, en donde la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a un agente reductor de glucosa que se va a administrar a un sujeto.

55 En varias realizaciones, la presente divulgación se basa en parte en que la administración oral de una composición farmacéutica que comprende una molécula de fusión que comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a un agente reductor de glucosa puede, entre otras cosas, proporcionar las siguientes ventajas: a) en realizaciones en las que la toxina de Cholix modificada se acopla al agente reductor de glucosa sin un conector, el efecto de anclaje de la toxina de Cholix modificada por su receptor o receptores en la superficie de las células que también expresan el receptor para el agente reductor de glucosa, puede permitir una mayor exposición del agente reductor de glucosa en la superficie de las células objetivo; b) en realizaciones en las que la toxina de Cholix modificada se acopla al agente reductor de glucosa con un conector que puede escindirse mediante una enzima presente en una membrana basal-lateral de una célula epitelial, o una enzima presente en el plasma del sujeto, tal escisión permitirá que el agente reductor de glucosa se libere del resto de la molécula de fusión poco después de la transcitosis a través de la membrana epitelial; c) la administración directa del agente reductor de glucosa al espacio submucosal-GI y al sistema hepático-portal puede reducir la toxicidad sistémica observada cuando los agentes reductores de glucosa se administran por vía parenteral, además de permitir el acceso a la biología objetivo

submucosal que era difícil de dirigir a través de vías no orales o GI; d) la administración directa del agente reductor de glucosa al espacio submucosal-GI y al sistema hepático-portal puede proporcionar mejores regímenes de dosificación, incluyendo inyecciones de insulina menos frecuentes; y e) la capacidad de administrar el agente reductor de glucosa a un sujeto sin usar una aguja para perforar la piel del sujeto, mejorando de este modo la calidad de vida de los sujetos evitando dolor y complicaciones potenciales asociadas con el mismo.

En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa se selecciona de, por ejemplo, una macromolécula, molécula pequeña, péptido, polipéptido, ácido nucleico, ARNm, miARN, ARNh_c, ARNip, molécula antisentido, anticuerpo, ADN, plásmido, vacuna, nanopartícula polimérica o material catalíticamente activo. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es una incretina o mimético de incretina. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es un GLP-1. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es un agonista de GLP-1. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es una exendina. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es un agonista del receptor de proteína inhibidora de glucosa (GIPR).

En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es un agonista de GLP-1 que es un péptido. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es un agonista de GLP-1 que es una molécula pequeña. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es un agonista de GLP-1 que es una molécula antisentido o de ARNip. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es un agonista de GLP-1 que es un anticuerpo, o un fragmento del mismo, o un constructo artificial que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, o un constructo artificial diseñada para imitar la unión de un anticuerpo o fragmento. del mismo a su antígeno.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un agente reductor de glucosa que es un péptido agonista de GLP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 93. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un agente reductor de glucosa que es un péptido agonista de GLP-1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 94.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden nuevas moléculas de fusión novedosas de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulados para administración oral y diseñados para proporcionar terapias eficaces mejoradas para el tratamiento de la deficiencia de la hormona del crecimiento, y trastornos similares.

En varias realizaciones, la presente divulgación se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de fusión de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulados para administración oral, en donde la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a una hormona del crecimiento (GH) para ser administrada a un sujeto.

En varias realizaciones, la presente divulgación se basa en parte en la visión única de los inventores de que la administración oral de una composición farmacéutica que comprende una molécula de fusión que comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a una hormona del crecimiento puede, entre otras cosas, proporcionar las siguientes ventajas: a) en realizaciones en las que la toxina de Cholix modificada está acoplada a la hormona del crecimiento con un conector que es escindible por una enzima presente en la superficie de la membrana basolateral de una célula epitelial, o una enzima presente en el plasma del sujeto, dicha escisión permitirá que la hormona del crecimiento se libere del resto de la molécula de fusión poco después de la transición a través de la membrana epitelial; b) la administración directa de la hormona del crecimiento al espacio submucosal-GI y al sistema hepático-portal puede reducir las toxicidades sistémicas observadas cuando las hormonas del crecimiento se administran por vía parenteral, además de permitir el acceso a la biología objetivo submucosal a la que era difícil apuntar a través de vías no orales o GI (por ejemplo, proporcionan una inducción más eficaz de IGF-1 con respecto a la administración sistémica mediante inyección subcutánea (sc)); c) la administración directa de la hormona del crecimiento al espacio submucosal-GI y al sistema hepático-portal puede proporcionar mejores regímenes de dosificación; d) la administración oral logrará un breve pulso de hormona del crecimiento en el hígado que es más consistente con el nivel sérico observado en niños en crecimiento, y este perfil de pulso no puede lograrse mediante inyección sc; y e) la capacidad de administrar la hormona del crecimiento a un sujeto sin usar una aguja para perforar la piel del sujeto, mejorando de este modo la calidad de vida de tales sujetos evitando el dolor o las posibles complicaciones asociadas con el mismo, además de mejorar la conveniencia y cumplimiento del paciente/proveedor de atención médica.

En varias realizaciones, la hormona del crecimiento se selecciona de, por ejemplo, una macromolécula, molécula pequeña, péptido, polipéptido, ácido nucleico, ARNm, miARN, ARNh_c, ARNip, molécula antisentido, anticuerpo, ADN, plásmido, vacuna, nanopartícula polimérica o material catalíticamente activo. En varias realizaciones, la hormona del crecimiento es la hormona del crecimiento humana (o una variante de la misma), la hormona del crecimiento 2 u hormona liberadora de la hormona del crecimiento. En varias realizaciones, la hormona del crecimiento es la hormona del crecimiento humana (somatotropina) que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 95.

En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix modificada acoplada

directamente a una carga biológicamente activa. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa se acopla directamente al extremo C-terminal de la toxina de Cholix.

5 En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix modificada acoplada químicamente a una carga biológicamente activa.

10 En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix acoplada a una carga biológicamente activa mediante un conector no escindible. En varias realizaciones, el conector no escindible comprende la secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 o SEQ ID NO: 99.

15 En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix acoplada a una carga biológicamente activa mediante un conector escindible. En varias realizaciones, el conector puede escindirse mediante una enzima que está presente en una membrana basolateral de una célula epitelial polarizada del sujeto. En varias realizaciones, el conector escindible comprende la secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, o SEQ ID NO: 120.

25 En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix acoplada a una carga biológicamente activa mediante un conector escindible, en donde el conector escindible comprende una secuencia de aminoácidos que se sabe que es un sustrato para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV). En varias realizaciones, el conector escindible comprende la secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 121.

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 122 (es decir Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10).

30 En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 123 (es decir Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10)

35 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad inflamatoria en un sujeto, que comprende administrar por vía oral una composición farmacéutica de la presente divulgación al sujeto. En varias realizaciones, la enfermedad inflamatoria se selecciona de una enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis o sepsis bacteriana. En varias realizaciones, la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de derivación, síndrome de Behcet o colitis indeterminada.

40 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad autoinmune en un sujeto, que comprende administrar por vía oral una composición farmacéutica de la presente divulgación al sujeto. En varias realizaciones, la enfermedad autoinmune es lupus eritematoso sistémico (SLE), pénfigo vulgar, miastenia grave, anemia hemolítica, trombocitopenia púrpura, enfermedad de Grave, enfermedad de Sjogren, dermatomiositis, enfermedad de Hashimoto, polimiositis, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple (MS), diabetes mellitus, artritis reumatoide o esclerodermia.

50 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrar por vía oral una composición farmacéutica de la presente divulgación al sujeto. En varias realizaciones, el cáncer a tratar incluye, pero no se limita a, linfomas no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiple, carcinomas de vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, nasofaringe, melanoma maligno NHL y leucemia resistentes a rituximab.

55 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno metabólico, dicho método comprendiendo administrar por vía oral una molécula de fusión de la presente divulgación en una cantidad suficiente para tratar dicho trastorno, en donde dicho trastorno metabólico es diabetes, obesidad, diabetes como consecuencia de obesidad, hiperglucemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, síndrome X, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada (IGT), dislipidemia diabética o hiperlipidemia.

60 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad del hígado graso (por ejemplo, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH)), una enfermedad gastrointestinal o una enfermedad neurodegenerativa, dicho método comprendiendo administrar por vía oral una molécula de fusión de la presente divulgación en una cantidad suficiente para tratar dicha enfermedad.

65 En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un

trastorno del crecimiento deficiente de GH, dicho método comprendiendo administrar por vía oral una molécula de fusión de la presente divulgación en una cantidad suficiente para tratar dicho trastorno, en donde dicho trastorno es una deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD), síndrome de Turner (TS), síndrome de Noonan, síndrome de Prader-Willi, deficiencia del gen que contiene homeobox de baja estatura (SHOX), insuficiencia renal crónica y síndrome de intestino corto de baja estatura idiopático, deficiencia de GH debido a tumores hipofisarios raros o su tratamiento y enfermedad de desgaste muscular asociada con el VIH/SIDA.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula de fusión de origen no natural de la presente divulgación para la preparación de un medicamento para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de una enfermedad inflamatoria en un sujeto con necesidad de ello.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula de fusión de origen no natural de la presente divulgación para la preparación de un medicamento para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de una enfermedad autoinmune en un sujeto con necesidad de ello.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula de fusión de origen no natural de la presente divulgación para la preparación de un medicamento para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de un cáncer en un sujeto con necesidad de ello.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula de fusión de origen no natural de la presente divulgación para la preparación de un medicamento para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de un trastorno metabólico en un sujeto con necesidad de ello.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula de fusión de origen no natural de la presente divulgación para la preparación de un medicamento para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de una enfermedad del hígado graso en un sujeto con necesidad de ello.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula de fusión de origen no natural de la presente divulgación para la preparación de un medicamento para el tratamiento, profilaxis y/o prevención del trastorno del crecimiento por deficiencia de GH en un sujeto con necesidad de ello.

En otros aspectos, la presente divulgación proporciona polinucleótidos que codifican las moléculas de fusión de carga biológicamente activa de toxina de Cholix modificadas de origen no natural de la presente divulgación; vectores que comprenden polinucleótidos que codifican moléculas de fusión de carga biológicamente activa de toxina de Cholix modificadas de origen no natural de la divulgación; opcionalmente, enlazadas operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector; células hospedadoras que comprenden vectores que comprenden polinucleótidos que codifican moléculas de fusión de carga biológicamente activa de toxina de Cholix modificadas de origen no natural de la divulgación; un proceso para producir una molécula de fusión de carga biológicamente activa de toxina de Cholix modificada de origen no natural de la divulgación que comprende cultivar células huésped que comprenden vectores que comprenden polinucleótidos que codifican moléculas de fusión de carga biológicamente activa de toxina de Cholix modificada de origen no natural de la divulgación de tal manera que el polinucleótido se expresa; y, opcionalmente, recupera la molécula de fusión de carga biológicamente activa de toxina de Cholix modificada de origen no natural del medio de cultivo de célula huésped.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 representa los constructos genéticos de dos moléculas de fusión de toxina de Cholix-IL-10 ejemplares evaluadas en la presente. El extremo N-terminal de una secuencia de monómero de IL-10 humana se unió genéticamente al extremo C-terminal de una toxina de Cholix modificada (Cholix⁴¹⁵) usando una secuencia conectora no escindible estable ((G₄S)₃) o una secuencia conectora que es un sustrato conocido para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV). Cada constructo también contiene una metionina N-terminal (M).

La FIG. 2 es una representación en diagrama de cinta de una molécula de fusión de "dímero toxina de Cholix-IL-10" ejemplar después del replegamiento que sería impulsada por la dimerización de IL-10. Los primeros 415 aminoácidos de la toxina de Cholix (SEQ ID NO: 1) se conectan a través de un conector de 16 aminoácidos (no mostrado) para conectar con la secuencia de IL-10 humana. Se prevé que la dimerización de IL-10 dé como resultado la organización Cholix⁴¹⁵ púrpura/hIL-10 azul y Cholix⁴¹⁵ naranja/verde mostrada.

La FIG. 3 es una SDS PAGE teñida con coomassie de Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10 (representado como "C") y Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 (representado como "N") después de la inducción y expresión de cuerpos de inclusión. Las moléculas de fusión expresadas demuestran el tamaño molecular anticipado de ~66 kDa que era comparable a la masa calculada de 66380,78 y 65958,25 Dalton, respectivamente. Se muestran los estándares de PM preteñidos con SeeBlue® Plus2.

La FIG. 4 es un gráfico de barras que representa los resultados de un ensayo de citometría de flujo usando una línea celular J774.2 derivada de macrófagos de ratón tratada con moléculas de fusión de toxina de Cholix-IL-10 ejemplares de la presente divulgación a dos concentraciones. El % de proliferación se midió a las 48 horas

después del tratamiento. Los valores representan $n=4 \pm$ desviación estándar. Los datos muestran que la molécula de fusión "dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10" demuestra IL-10 biológicamente activa.

La FIG. 5 es un gráfico de líneas que representa los resultados de un ensayo en donde se probó la molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 para determinar los efectos sobre las propiedades de barrera de las monocapas de células Caco-2 *in vitro*. Se añadió dextrano de 70 kDa marcado con fluoresceína y concentraciones variables de molécula de fusión dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 a la superficie apical de estas monocapas y se monitorizó la cantidad acumulada de fluorescencia detectada en el compartimento basal a lo largo del tiempo recogiendo volúmenes de 150 μ l con sustitución. Los niveles acumulados de dextrano basal (pmol) se representan frente al tiempo. Cada línea representa la media ($n=4$) de los valores de fluorescencia basales medidos a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 min.

La FIG. 6 es un gráfico de líneas que representa los resultados de un ensayo en donde se probó la molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 para determinar los efectos sobre las propiedades de barrera de las monocapas de células Caco-2 *in vitro*. Se añadió dextrano de 70 kDa marcado con fluoresceína y concentraciones variables de molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 a la superficie apical de estas monocapas y se monitorizó la cantidad acumulada de fluorescencia detectada en el compartimento basal a lo largo del tiempo.

Las FIG. 7A y 7B son gráficos de líneas que representan los resultados de un ensayo ELISA que evalúa la capacidad de la molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 para moverse a través de las monocapas de células Caco-2. La cantidad acumulada de la molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 que alcanza el compartimento basal con el tiempo después de una adición apical a varias concentraciones indicadas en la leyenda. Cada línea representa la media ($n=4$) de los niveles basales de IL-10 medidos a los 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 y 240 min. La IL-10 acumulada transportada a lo largo del tiempo se representó gráficamente en un intervalo de 6A = 8000 fmol de IL-10 expandida y 6B = 1000 fmol de IL-10.

25 MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

A menos que se defina lo contrario en la presente, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente divulgación tendrán los significados entendidos comúnmente por los expertos en la técnica. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán el plural y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química e hibridación de proteínas y ácidos nucleicos descritas en la presente son las usadas comúnmente y bien conocidas en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente divulgación se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en varias referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva a menos que se indique lo contrario. Ver, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992) y Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante, como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en la presente. La nomenclatura usada en relación con los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química farmacéutica y medicinal descritas en la presente son las comúnmente usadas y bien conocidas en la técnica. Se usan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación y administración farmacéutica, y tratamiento de pacientes.

45 Definiciones

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. En varias realizaciones, "péptidos", "polipéptidos" y "proteínas" son cadenas de aminoácidos cuyos carbonos alfa están enlazados a través de enlaces peptídicos. Por lo tanto, el aminoácido terminal en un extremo de la cadena (amino terminal) tiene un grupo amino libre, mientras que el aminoácido terminal en el otro extremo de la cadena (terminal carboxi) tiene un grupo carboxilo libre. Como se usa en la presente, el término "amino terminal" (abreviado N-terminal) se refiere al grupo α -amino libre en un aminoácido en el amino terminal de un péptido o al grupo α -amino (grupo imino cuando participa en un enlace peptídico) de un aminoácido en cualquier otra localización dentro del péptido. De manera similar, el término "terminal carboxi" se refiere al grupo carboxilo libre en el extremo terminal carboxi de un péptido o al grupo carboxilo de un aminoácido en cualquier otra localización dentro del péptido. Los péptidos también incluyen esencialmente cualquier poliaminoácido, incluyendo, pero no limitados a, miméticos de péptidos como aminoácidos unidos por un éter en oposición a un enlace amida.

Los polipéptidos de la divulgación incluyen polipéptidos que se han modificado de cualquier manera y por cualquier motivo, por ejemplo, para: (1) reducir la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducir la susceptibilidad a la oxidación, (3) alterar la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alterar las afinidades de unión y (5) conferir o modificar otras propiedades fisicoquímicas o funcionales. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de uno o múltiples aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras) en la secuencia de origen

natural (por ejemplo, en la parte del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares). Una "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a la sustitución en un polipéptido de un aminoácido por un aminoácido funcionalmente similar. Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras de uno por otro:

- 1) Alanina (A), Serina (S) y Treonina (T)
- 2) Ácido aspártico (D) y Ácido glutámico (E)
- 3) Asparagina (N) y Glutamina (Q)
- 4) Arginina (R) y Lisina (K)
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M) y Valina (V)
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y) y Triptófano (W)

Una "sustitución de aminoácidos no conservadora" se refiere a la sustitución de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Al realizar tales cambios, de acuerdo con varias realizaciones, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en base a sus características de hidrofobicidad y carga. Son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5).

En la técnica se entiende la importancia del índice hidropático de aminoácidos para conferir una función biológica interactiva a una proteína (ver, por ejemplo, Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). Se sabe que ciertos aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tienen un índice o puntuación hidropática similar y todavía conservan una actividad biológica similar. Al realizar cambios basados en el índice hidropático, en varias realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de +2. En varias realizaciones, se incluyen los que están dentro de +1, y en varias realizaciones, se incluyen los que están dentro de +0,5.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente en base a la hidrofiliidad, particularmente cuando la proteína o péptido biológicamente funcional creado de este modo está destinado a ser usado en realizaciones inmunológicas, como se divulga en la presente. En varias realizaciones, la hidrofiliidad media local más alta de una proteína, gobernada por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenicidad y antigenicidad, es decir, con una propiedad biológica de la proteína.

Se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a estos residuos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0, +-,1); glutamato (+3,0,+-,1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5, +-,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5) y triptófano (-3,4). Al realizar cambios basados en valores de hidrofiliidad similares, en varias realizaciones, se incluye la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de +2, en varias realizaciones, se incluyen aquellos que están dentro de +1, y en varias realizaciones, se incluyen aquellos dentro de $\pm 0,5$.

En la Tabla 1 se muestran sustituciones de aminoácidos ejemplares.

<u>Tabla 1</u>		
Sustituciones de aminoácidos		
Residuos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gin, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
Su	Asn, Gin, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, ácido 1,4 diamino-butírico, Gin, Asn	Arg

(continuación)
Sustituciones de aminoácidos

	Residuos originales	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferidas
	Met	Leu, Phe, Ile	Leu
	Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
	Pro	Ala	Gly
5	Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
	Thr	Ser	Ser
	Trp	Tyr, Phe	Tyr
	Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
10	Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Un experto en la técnica podrá determinar variantes adecuadas de polipéptidos como se expone en la presente usando técnicas bien conocidas. En varias realizaciones, un experto en la técnica puede identificar áreas adecuadas de la molécula que pueden cambiarse sin destruir la actividad dirigiendo regiones que no se cree que sean importantes para la actividad. En otras realizaciones, el experto en la técnica puede identificar residuos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. En realizaciones adicionales, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a sustituciones conservadoras de aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente a la estructura del polipéptido.

Además, un experto en la técnica puede revisar estudios de estructura-función que identifican residuos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o estructura. En vista de tal comparación, el experto en la técnica puede predecir la importancia de los residuos de aminoácidos en un polipéptido que corresponden a los residuos de aminoácidos importantes para la actividad o estructura en polipéptidos similares. Un experto en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para tales residuos de aminoácidos importantes previstos.

Un experto en la técnica también puede analizar la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esa estructura en polipéptidos similares. En vista de tal información, un experto en la técnica puede predecir el alineamiento de los residuos de aminoácidos de un polipéptido con respecto a su estructura tridimensional. En varias realizaciones, un experto en la técnica puede optar por no realizar cambios radicales en los residuos de aminoácidos que se prevé que estén en la superficie del polipéptido, ya que tales residuos pueden estar implicados en interacciones importantes con otras moléculas. Además, un experto en la técnica puede generar variantes de prueba que contengan una sustitución de aminoácidos individual en cada residuo de aminoácido deseado. A continuación, las variantes pueden seleccionarse usando ensayos de actividad conocidos por los expertos en la técnica. Tales variantes podrían usarse para recopilar información sobre variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre que un cambio en un residuo de aminoácido particular da como resultado una actividad destruida, indeseablemente reducida o inadecuada, pueden evitarse las variantes con tal cambio. En otras palabras, en base a la información recopilada de tales experimentos de rutina, un experto en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deben evitarse sustituciones adicionales, ya sea solas o en combinación con otras mutaciones.

El término "fragmento de polipéptido" y "polipéptido truncado" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal en comparación con una proteína de longitud completa correspondiente. En varias realizaciones, los fragmentos pueden tener, por ejemplo, por lo menos 5, por lo menos 10, por lo menos 25, por lo menos 50, por lo menos 100, por lo menos 150, por lo menos 200, por lo menos 250, por lo menos 300, por lo menos 350, por lo menos 400, por lo menos 450, por lo menos 500, por lo menos 600, por lo menos 700, por lo menos 800, por lo menos 900 o por lo menos 1000 aminoácidos de longitud. En varias realizaciones, los fragmentos también pueden tener, por ejemplo, como máximo 1000, como máximo 900, como máximo 800, como máximo 700, como máximo 600, como máximo 500, como máximo 450, como máximo 400, como máximo 350, como máximo 300, como máximo 250, como máximo 200, como máximo 150, como máximo 100, como máximo 50, como máximo 25, como máximo 10 o como máximo 5 aminoácidos de longitud. Un fragmento puede comprender además, en uno o en ambos de sus extremos, uno o más aminoácidos adicionales, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de una proteína de origen natural diferente (por ejemplo, un dominio de cremallera Fc o leucina) o una secuencia de aminoácidos artificial (por ejemplo, una secuencia conectora artificial).

Los términos "variante de polipéptido" y "mutante de polipéptido" como se usan en la presente se refieren a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en la que uno o más residuos de aminoácidos se insertan, eliminan y/o sustituyen en la secuencia de aminoácidos con respecto a otra secuencia de polipéptidos. En varias realizaciones, el número de residuos de aminoácidos que se insertarán, eliminarán o sustituirán puede ser, por ejemplo, por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 10, por lo menos 25, por lo menos 50, por lo menos 75, por lo menos 100, por lo menos 125, por lo menos 150, por lo menos 175, por lo menos 200, por lo menos 225, por lo menos 250, por lo menos 275, por lo menos 300, por lo menos 350, por lo menos 400, por lo menos 450 o por lo menos 500 aminoácidos de longitud. Las variantes de la presente

divulgación incluyen proteínas de fusión.

Un "derivado" de un polipéptido es un polipéptido que se ha modificado químicamente, por ejemplo, conjugación con otra fracción química como, por ejemplo, polietilenglicol, albúmina (por ejemplo, albúmina de suero humano), fosforilación y glicosilación.

El término "% de identidad de secuencia" se usa indistintamente en la presente con el término "% de identidad" y se refiere al nivel de identidad de secuencias de aminoácidos entre dos o más secuencias de péptidos o al nivel de identidad de secuencias de nucleótidos entre dos o más secuencias de nucleótidos, cuando se alinean usando un programa de alineamiento de secuencias. Por ejemplo, como se usa en la presente, 80% de identidad significa lo mismo que 80% de identidad de secuencia determinada por un algoritmo definido, y significa que una secuencia dada es por lo menos un 80% idéntica a otra longitud de otra secuencia. En varias realizaciones, el % de identidad se selecciona de, por ejemplo, por lo menos un 60%, por lo menos un 65%, por lo menos un 70%, por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, o por lo menos un 99% o más de identidad de secuencia con una secuencia dada. En varias realizaciones, el % de identidad está en el intervalo de, por ejemplo, de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 85%, de aproximadamente el 85% a aproximadamente el 90%, de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 95%, o de aproximadamente el 95% a aproximadamente el 99%.

El término "% de homología de secuencia" se usa indistintamente en la presente con el término "% de homología" y se refiere al nivel de homología de secuencias de aminoácidos entre dos o más secuencias de péptidos o al nivel de homología de secuencias de nucleótidos entre dos o más secuencias de nucleótidos, cuando se alinean usando un programa de alineación de secuencias. Por ejemplo, como se usa en la presente, 80% de homología significa lo mismo que 80% de homología de secuencia determinada por un algoritmo definido y, por consiguiente, un homólogo de una secuencia dada tiene más del 80% de homología de secuencia en una longitud de la secuencia dada. En varias realizaciones, el % de homología se selecciona de, por ejemplo, por lo menos un 60%, por lo menos un 65%, por lo menos un 70%, por lo menos un 75%, por lo menos un 80%, por lo menos un 85%, por lo menos un 90%, por lo menos un 95%, o por lo menos un 99% o más de homología de secuencia con una secuencia dada. En varias realizaciones el % de homología se selecciona de, por ejemplo, de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 70%, de aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80%, de aproximadamente el 80% a aproximadamente el 85%, de aproximadamente el 85% a aproximadamente el 90%, de aproximadamente el 90% a aproximadamente el 95%, o de aproximadamente el 95% a aproximadamente el 99%.

Los programas informáticos ejemplares que pueden usarse para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX y TBLASTX, BLASTP y TBLASTN, disponibles públicamente en Internet en el sitio web de NCBI. Ver también Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-10 (con especial referencia a la configuración predeterminada publicada, es decir, parámetros $w=4$, $t=17$) y Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402. Las búsquedas de secuencias se llevan a cabo típicamente usando el programa BLASTP cuando se evalúa una secuencia de aminoácidos dada con respecto a las secuencias de aminoácidos en las secuencias de proteínas de GenBank y otras bases de datos públicas. Se prefiere el programa BLASTX para buscar secuencias de ácidos nucleicos que se han traducido en todos los marcos de lectura frente a secuencias de aminoácidos en las secuencias de proteínas de GenBank y otras bases de datos públicas. Tanto BLASTP como BLASTX se ejecutan usando los parámetros predeterminados de una penalización por espacio abierto de 11,0 y una penalización por espacio extendido de 1,0, y utilizan la matriz BLOSUM-62. Ver id.

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (ver, por ejemplo, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es, por ejemplo, como máximo 0,1, como máximo 0,01 o como máximo 0,001.

"Polinucleótido" se refiere a un polímero compuesto por unidades de nucleótidos. Los polinucleótidos incluyen ácidos nucleicos de origen natural, como ácido desoxirribonucleico ("ADN") y ácido ribonucleico ("ARN"), así como análogos de ácidos nucleicos. Los análogos de ácidos nucleicos incluyen aquellos que incluyen bases de origen no natural, nucleótidos que se acoplan en enlaces con otros nucleótidos distintos del enlace fosfodiéster de origen natural o que incluyen bases unidas a través de enlaces distintos de los enlaces fosfodiéster. Por tanto, los análogos de nucleótidos incluyen, por ejemplo y sin limitación, fosforotioatos, fosforditioatos, fosforotriésteres, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, péptido-ácidos nucleicos (PNA) y similares. Tales polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado. El término "ácido nucleico" se refiere típicamente a polinucleótidos grandes. El término

"oligonucleótido" se refiere típicamente a polinucleótidos cortos, generalmente no mayores de aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esta también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza "T."

5 En la presente se usa notación convencional para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polinucleótidos de cadena sencilla es el extremo 5'; la dirección izquierda de una secuencia de polinucleótidos de cadena doble se denomina dirección 5'. La dirección de la adición 5' a 3' de nucleótidos a las transcripciones de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante"; las secuencias de la cadena de ADN que
10 tienen la misma secuencia que un ARNm transcrito a partir de ese ADN y que están localizadas 5' al extremo 5' de la transcripción de ARN se denominan "secuencias cadena en sentido ascendente"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 3'al extremo 3' de la transcripción de ARN codificante se denominan "secuencias en sentido descendente".

15 "Complementario" se refiere a la compatibilidad topológica o emparejamiento de superficies interactuantes de dos polinucleótidos. Por tanto, las dos moléculas pueden describirse como complementarias y, además, las características de la superficie de contacto son complementarias entre sí. Un primer polinucleótido es complementario de un segundo polinucleótido si la secuencia de nucleótidos del primer polinucleótido es sustancialmente idéntica a la secuencia de nucleótidos de la pareja de unión de polinucleótidos del segundo polinucleótido, o si el primer polinucleótido puede hibridar con el segundo polinucleótido en condiciones de hibridación rigurosas.
20

"Hibridar específicamente con" o "hibridación específica" o "hibridar selectivamente con", se refiere a la unión, duplicación o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones estrictas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ADN o ARN (por ejemplo, celular total). El término "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones en las que una sonda se hibridará preferentemente con su subsecuencia objetivo y, en menor grado, o no con otras secuencias. La "hibridación rigurosa" y las "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos como las hibridaciones Southern y Northern son dependientes de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Una guía exhaustiva para la hibridación de ácidos nucleicos puede encontrarse en Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, parte I, capítulo 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, N.Y.; Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3.sup.rd ed., NY; y Ausubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.
25
30
35

Generalmente, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5º C más bajas que el punto de fusión térmico (Tm) para la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. El Tm es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia objetivo se hibrida con una sonda perfectamente adaptada. Se seleccionan condiciones muy estrictas para que sean iguales al Tm para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación estrictas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de aproximadamente 100 residuos complementarios en un filtro en una transferencia Southern o Northern es formalina al 50% con 1 mg de heparina a 42º C, la hibridación llevándose a cabo durante la noche. Un ejemplo de condiciones de lavado muy rigurosas es NaCl 0,15 M a 72º C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de condiciones de lavado rigurosas es un lavado 0,2 x SSC a 65º C durante 15 minutos. Ver Sambrook et al. para obtener una descripción del tampón SSC. Un lavado de alta rigurosidad puede ir precedido de un lavado de baja rigurosidad para eliminar la señal de la sonda de fondo. Un lavado de rigurosidad media ejemplar para un dúplex de, por ejemplo, más de aproximadamente 100 nucleótidos, es 1 x SSC a 45º C durante 15 minutos. Un lavado de baja rigurosidad ejemplar para un dúplex de, por ejemplo, más de aproximadamente 100 nucleótidos, es 4-6 x SSC a 40º C durante 15 minutos. En general, una relación señal/ruido de 2 x (o mayor) que la observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica la detección de una hibridación específica.
40
45
50

"Cebador" se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridar específicamente con una plantilla de polinucleótidos designada y proporcionar un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario. Tal síntesis se produce cuando el cebador de polinucleótidos se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, una plantilla de polinucleótidos complementaria y un agente de polimerización como la ADN polimerasa. Un cebador es típicamente de cadena sencilla, pero puede ser de cadena doble. Los cebadores son típicamente ácidos desoxirribonucleicos, pero una amplia variedad de cebadores sintéticos y naturales son útiles para muchas aplicaciones. Un cebador es complementario a la plantilla con la que está diseñado para hibridar para servir como un sitio para el inicio de la síntesis, pero no es necesario que refleje la secuencia exacta de la plantilla. En tal caso, la hibridación específica del cebador con la plantilla depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden marcarse con, por ejemplo, fracciones cromogénicas, radiactivas o fluorescentes y usarse como fracciones detectables.
55
60
65

"Sonda", cuando se usa en referencia a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridar específicamente con una secuencia designada de otro polinucleótido. Una sonda hibrida específicamente con un polinucleótido complementario objetivo, pero no necesita reflejar la secuencia complementaria exacta de la plantilla. En tal caso, la hibridación específica de la sonda con el objetivo depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden marcarse con, por ejemplo, fracciones cromogénicas, radiactivas o fluorescentes y usarse como fracciones detectables. En los casos en los que una sonda proporciona un punto de inicio para la síntesis de un polinucleótido complementario, una sonda también puede ser un cebador.

Un "vector" es un polinucleótido que puede usarse para introducir otro ácido nucleico enlazado con él en una célula. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a una molécula de ADN de cadena doble lineal o circular en la que pueden ligarse segmentos de ácidos nucleicos adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral (por ejemplo, retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), en donde pueden introducirse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que comprenden un origen de replicación bacteriano y vectores de mamíferos episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamíferos no episomales) se integran en el genoma de una célula huésped tras su introducción en la célula huésped, y por lo tanto se replican junto con el genoma del huésped. Un "vector de expresión" es un tipo de vector que puede dirigir la expresión de un polinucleótido elegido.

Una "secuencia reguladora" es un ácido nucleico que afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, la cadencia o la localización de la expresión) de un ácido nucleico al que está enlazado operativamente. La secuencia reguladora puede, por ejemplo, ejercer sus efectos directamente sobre el ácido nucleico regulado, o mediante la acción de una o más de otras moléculas (por ejemplo, polipéptidos que se unen a la secuencia reguladora y/o al ácido nucleico). Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Ejemplos adicionales de secuencias reguladoras se describen en, por ejemplo, Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. y Baron et al., 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06. Una secuencia de nucleótidos está "operativamente enlazada" con una secuencia reguladora si la secuencia reguladora afecta a la expresión (por ejemplo, el nivel, la cadencia o la localización de la expresión) de la secuencia de nucleótidos.

Una "célula huésped" es una célula que puede usarse para expresar un polinucleótido de la divulgación. Una célula huésped puede ser una procariota, por ejemplo, *E. coli*, o puede ser una eucariota, por ejemplo, una eucariota unicelular (por ejemplo, una levadura u otro hongo), una célula vegetal (por ejemplo, una célula de planta de tabaco o tomate), una célula animal (por ejemplo, una célula humana, una célula de mono, una célula de hámster, una célula de rata, una célula de ratón o una célula de insecto) o un hibridoma. Típicamente, una célula huésped es una célula cultivada que puede transformarse o transfectarse con un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que luego puede expresarse en la célula huésped. La frase "célula huésped recombinante" puede usarse para indicar una célula huésped que ha sido transformada o transfectada con un ácido nucleico que se va a expresar. Una célula huésped también puede ser una célula que comprende el ácido nucleico pero que no lo expresa al nivel deseado a menos que se introduzca una secuencia reguladora en la célula huésped de tal manera que se enlace operativamente con el ácido nucleico. Se entiende que el término célula huésped se refiere no solo a la célula sujeto particular sino a la progenie o progenie potencial de dicha célula. Como pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a, por ejemplo, mutación o influencia ambiental, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula original, pero todavía está incluida dentro del alcance del término como se usa en la presente.

El término "molécula aislada" (donde la molécula es, por ejemplo, un polipéptido o un polinucleótido) es una molécula que en virtud de su origen o fuente de derivación (1) no está asociada a componentes asociados de manera natural que la acompañan en su estado nativo, (2) está sustancialmente libre de otras moléculas de la misma especie (3) es expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no se encuentra en la naturaleza. Por tanto, una molécula que se sintetiza químicamente, o se expresa en un sistema celular diferente de la célula de la que se origina de manera natural, será "aislada" de sus componentes asociados de manera natural. Una molécula también puede quedar sustancialmente libre de componentes asociados de manera natural mediante aislamiento, usando técnicas de purificación bien conocidas en la técnica. La pureza u homogeneidad de la molécula puede ensayarse mediante una serie de medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la pureza de una muestra de polipéptido puede probarse usando electroforesis en gel de poli(acrilamida) y tinción del gel para visualizar el polipéptido usando técnicas bien conocidas en la técnica. Para ciertos propósitos, puede proporcionarse una resolución más alta usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para la purificación.

Una proteína o polipéptido es "sustancialmente puro", "sustancialmente homogéneo" o "sustancialmente purificado" cuando por lo menos aproximadamente del 60% al 75% de una muestra presenta una única especie de polipéptido. El polipéptido o proteína puede ser monomérico o multimérico. Un polipéptido o proteína sustancialmente puro comprenderá típicamente aproximadamente el 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra de proteína, más habitualmente aproximadamente el 95% y, por ejemplo, tendrá una pureza superior al 99%. La pureza u homogeneidad de la proteína puede indicarse mediante una serie de medios bien conocidos en la

técnica, como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de visualización de una única banda de polipéptido tras teñir el gel con una tinción bien conocida en la técnica. Para ciertos propósitos, puede proporcionarse una resolución más alta usando HPLC u otros medios bien conocidos en la técnica para la purificación.

5 "Conector" se refiere a una molécula que se une a otras dos moléculas, ya sea de manera covalente o mediante enlaces iónicos, de van der Waals o de hidrógeno, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que se hibrida con una secuencia complementaria en el extremo 5' y con otra secuencia complementaria en el extremo 3', uniéndose de este modo dos secuencias no complementarias. Un "conector escindible" se refiere a un conector que puede degradarse o cortarse de otro modo para separar los dos componentes conectados por el conector escindible. Los conectores escindibles generalmente se escinden mediante enzimas, típicamente peptidasas, proteasas, nucleasas, lipasas y similares. Los conectores escindibles también pueden escindirse por señales ambientales como, por ejemplo, actividades enzimáticas específicas, cambios de temperatura, pH, concentración de sal, etc. cuando hay tal cambio en el entorno después de la transición de las moléculas de fusión a través de una membrana epitelial polarizada.

10 "Composición farmacéutica" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico en un animal. Una composición farmacéutica comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un agente activo y un portador farmacéuticamente aceptable. "Cantidad farmacológicamente eficaz" se refiere a la cantidad de un agente eficaz para producir el resultado farmacológico deseado.

15 "Portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquiera de los portadores, vehículos, tampones y excipientes farmacéuticos estándar, como una solución salina tamponada con fosfato, una solución acuosa al 5% de dextrosa y emulsiones, como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Los portadores y formulaciones farmacéuticas adecuadas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 21ª Ed. 2005, Mack Publishing Co, Easton.. Una "sal farmacéuticamente aceptable" es una sal que puede formularse en un compuesto para uso farmacéutico incluyendo, por ejemplo, sales metálicas (sodio, potasio, magnesio, calcio, etc.) y sales de amoníaco o aminas orgánicas.

20 Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o abrogar un trastorno biológico y/o por lo menos uno de sus síntomas acompañantes. Como se usa en la presente, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o la frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Además, las referencias en la presente a "tratamiento" incluyen referencias a tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

25 **Polipéptidos de toxina de Cholix modificados**

La toxina de Cholix madura (Jorgensen, R. et al., J Biol Chem 283(16): 10671-10678 (2008)), como se usa en la presente, es una proteína de 70,7 kD y 634 residuos, cuya secuencia se expone en la SEQ ID NO: 1:

30 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDK
GESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE

35 DSPASIKISVDELQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPS
VSYKAAQKEGSRHKRWAWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYET
VAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDD
40 LSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLHDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQV
LTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR
50 SGRSYLPENRAVITPQGVNTWYQELEATHQALTREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRI
APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGARYRIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV
YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIH
55 AVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK (SEQ ID NO: 1)

60 En varias realizaciones, la toxina de Cholix tiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

Un ácido nucleico ejemplar que codifica la toxina de Cholix madura se expone en la SEQ ID NO: 2:

65

ATGGTCGAAGAAGCTTTAAACATCTTTGATGAATGCCGTTCGCCATGTTTCGTTGACCCCGGA
 ACCGGGTAAGCCGATTCAATCAAACACTGTCTATCCCTAGTGATGTTGTTCTGGATGAAGGTG
 TTCTGTATTACTCGATGACGATTAATGATGAGCAGAATGATATTAAGGATGAGGACAAAGGC
 5 GAGTCCATTATCACTATTGGTGAATTTGCCACAGTACGCGCGACTAGACATTATGTTAATCAA
 GATGCGCCTTTTGGTGTCCATTTAGATATTACGACAGAAAATGGTACAAAACGTA
 TATAACCGCAAAGAGGGTGAATTTGCAATCAATTGGTTAGTGCCTATTGGTGAAGATTCTCCT
 GCAAGCATCAAATCTCCGTTGATGAGCTCGATCAGCAACGCAATATCATCGAGGTGCCTAA
 ACTGTATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTTAGAGCAGTGGAAAACCAAGGTAATGTTTC
 10 TTTTTCGGTAACGCGTCTGAACATAATATCGCTATCTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAAAG
 CAGCGCAGAAAGAGGGTTACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGGCATAACAGGCTTAGCACT
 GTGTTGGCTTGTGCCAATGGATGCTATCTATAACTATATCACCCAGCAAATTTGACTTTAGG
 GGATAATTTGGTGGTCTTATGAGACTGTTGCAGGCACTCCGAAGGTGATTACGGTTA
 AGCAAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAGCAGCGCATCCATTTCTCCAAGGGGAATGCGAT
 15 GAGCGCACTTGCTGCTCATCGCGTCTGTGGTGTGCCATTAGAACTTTGGCGCGCAGTCGC
 AAACCTCGTGATCTGACGGATGATTTATCATGTGCCTATCAAGCGCAGAATATCGTGAGTTTA
 TTTGTGCGGACGCGTATCCTGTTCTCTCATCTGGATAGCGTATTTACTCTGAATCTTGACGAA
 CAAGAACCAGAGGTGGCTGAACGTCTAAGTGATCTTCGCCGTATCAATGAAAATAACCCGG
 GCATGGTTACACAGGTTTTAACCGTTGCTCGTCAGATCTATAACGATTATGTCACTCACCATC
 20 CGGGCTTAACCTCCTGAGCAAACCAGTGCGGGTGCACAAGCTGCCGATATCCTCTCTTTATTT
 TGCCCAGATGCTGATAAGTCTTGTGTGGCTTCAAACAACGATCAAGCCAATATCAACATCGA
 GTCTCGTTCTGGCCGTTTCATATTTGCCTGAAAACCGTGCCGTAATCACCCCTCAAGGCGTCA
 CAAATTGGACTTACCAGGAACCTCGAAGCAACACATCAAGCTCTGACTCGTGAGGGTTATGTG
 25 TTCGTGGGTTACCATGGTACGAATCATGTGCGTGCACAAACCATCGTGAATCGCATTGCCCC
 TGTTCGCGCGGCAACAACACTGAAAACGAGGAAAAGTGGGGCGGGTTATATGTTGCAACT
 CACGCTGAAGTTGCCATGGTTATGCTCGCATCAAAGAAGGGACAGGGGAGTATGGCCTTC
 CGACCCGTGCTGAGCGCGACGCTCGTGGGGTAATGCTGCGCGTGTATATCCCTCGTGCTTC
 ATTAGAACGTTTTTATCGCACGAATACACCTTTGGAAAATGCTGAGGAGCATATCACGCAAGT
 30 GATTGGTCACTTTTGGCATTACGCAATGAAGCATTTACTGGTCCAGAAAGTGCGGGCGGGG
 AAGACGAACTGTCATTGGCTGGGATATGGCGATTCATGCAGTTGCGATCCCTTCGACTATC
 CCAGGGAACGCTTACGAAGAATTGGCGATTGATGAGGAGGCTGTTGCAAAAGAGCAATCGA
 TTAGCACAAAACACCTTATAAAGAGCGCAAAGATGAACTTAAG (SEQ ID NO: 2)

35 En varias realizaciones, la toxina de Cholix contiene una secuencia de ácidos nucleicos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

40 En varias realizaciones, la toxina de Cholix modificada usada en la preparación de las moléculas de fusión es una toxina de Cholix truncada, en donde la molécula de fusión tiene la capacidad de activar el receptor para la carga biológicamente activa. Una toxina de Cholix truncada como se describe en la presente se identificará por referencia a los residuos de aminoácidos que comprenden la toxina de Cholix truncada, por ejemplo, una toxina de Cholix truncada que consiste de los residuos de aminoácidos 1-386 de la SEQ ID NO: 1 se identificará como Cholix³⁸⁶.

50 En varias realizaciones, la toxina de Cholix modificada usada en la preparación de la molécula de fusión es la toxina de Cholix mutada. Como se describe en la presente, una toxina de Cholix mutada en donde la mutación implica una delección de un residuo de aminoácido se identificará por referencia al residuo de aminoácido que se está eliminando, por ejemplo, una toxina de Cholix mutada en la que se ha eliminado el aminoácido E581 de la SEQ ID NO: 1, se identificará como "Cholix ΔE581". Una toxina de Cholix mutada en donde la mutación implica la sustitución de un residuo de aminoácido se identificará por referencia a la sustitución de aminoácido particular en un residuo de aminoácido específico. Por tanto, por ejemplo, el término "S30A" indica que el residuo "S" (serina, en el código estándar de una sola letra) en la posición 30 en la SEQ ID NO: 1 se ha sustituido por una "A" (alanina, en el código de una letra estándar) incluso si el residuo aparece en una toxina de Cholix truncada, y la toxina modifica se identificará como "Cholix^{S30A}".

60 El dominio la de la toxina de Cholix (aminoácidos 1-265 de la SEQ ID NO: 1) es un "dominio de unión al receptor" que funciona como un ligando para un receptor de la superficie celular y media la unión de la molécula de fusión a una célula, por ejemplo, el dominio la se unirá a un receptor de la superficie celular que está presente en la membrana apical de una célula epitelial, con suficiente afinidad para permitir la endocitosis de la molécula de fusión. El dominio 1a puede unirse a cualquier receptor que se sepa que está presente en la membrana apical de una célula epitelial por un experto en la técnica sin limitación. Por ejemplo, el dominio de unión al receptor puede unirse a α2-MR. Pueden realizarse sustituciones conservadoras o no conservadoras en la secuencia de aminoácidos del

fusión a una célula. En varias realizaciones, las moléculas de fusión comprenden una toxina de Cholix que comprende un dominio la mutado.

5 En varias realizaciones, el dominio la comprende un dominio de unión al receptor de células presentadoras de antígeno (APC). En varias realizaciones, el dominio de unión al receptor de APC es el dominio de reconocimiento celular del dominio la de Cholix o una porción del dominio la de Cholix suficiente para acoplarse con un receptor de superficie celular en las APC.

10 En varias realizaciones, el dominio de unión al receptor de APC se une a un receptor identificado como presente en una célula dendrítica u otra APC. Los ejemplos de receptores de superficie celular en APC pueden incluir, pero no se limitan a, DEC-205 (CD205), CD207, CD209, CD11a, CD11b, CD11c, CD36, CD14, CD50, CD54, CD58, CD68, CD80, CD83, CD86, CD102, CD3, CD14, CD19, Clec9a, CMFR-44, dectin-1, dectin-2, FLT3, HLA-DR, LOX-1, MHC II, BDCA-1, DC-SIGN, receptores tipo Toll (TLR)-2, -3, -4 y -7, y receptor de α 2-macroglobulina (" α 2-MR"). En varias realizaciones, el dominio de unión al receptor de APC es α 2-MR.

15 El dominio II de la toxina de Cholix (aminoácidos 266-386 de la SEQ ID NO: 1) es un "dominio de transcitosis" que media la transcitosis desde una luz que bordea la superficie apical de una membrana mucosa hasta el lado basolateral de una membrana mucosa. Como se menciona 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 de la membrana basolateral de la célula epitelial polarizada. Las moléculas de fusión de la presente divulgación pueden comprender una toxina de Cholix modificada que comprende la secuencia de aminoácidos completa del Dominio II, o pueden comprender porciones del Dominio II, siempre que no se elimine sustancialmente la actividad de transcitosis. Además, pueden realizarse sustituciones conservadoras o no conservadoras en la secuencia de aminoácidos del dominio de transcitosis, siempre que no se elimine sustancialmente la actividad de transcitosis. En la presente se describe un ensayo representativo que puede usarse de manera rutinaria por un experto en la técnica para determinar si un dominio de transcitosis tiene actividad de transcitosis. Como se usa en la presente, la actividad de transcitosis no se elimina sustancialmente siempre que la actividad sea, por ejemplo, por lo menos el 40%, por lo menos el 50%, por lo menos el 60%, por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95% o por lo menos el 99% en comparación con una toxina de Cholix modificada que comprende la secuencia de aminoácidos completa del Dominio II.

20 En varias realizaciones, las moléculas de fusión de origen no natural comprenden una toxina de Cholix modificada truncada en un residuo de aminoácido dentro del dominio II de la toxina de Cholix, en donde la molécula de fusión tiene la capacidad de activar el receptor para la carga biológicamente activa. En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸⁶ (SEQ ID NO: 3). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸⁵ (SEQ ID NO: 4). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸⁴ (SEQ ID NO: 5). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸³ (SEQ ID NO: 6). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸² (SEQ ID NO: 7). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸¹ (SEQ ID NO: 8). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸⁰ (SEQ ID NO: 9). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷⁹ (SEQ ID NO: 10). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷⁸ (SEQ ID NO: 11). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷⁷ (SEQ ID NO: 12). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷⁶ (SEQ ID NO: 13). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷⁵ (SEQ ID NO: 14). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷⁴ (SEQ ID NO: 15). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷³ (SEQ ID NO: 16). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷² (SEQ ID NO: 17). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷¹ (SEQ ID NO: 18). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁷⁰ (SEQ ID NO: 19). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶⁹ (SEQ ID NO: 20). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶⁸ (SEQ ID NO: 21). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶⁷ (SEQ ID NO: 22). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶⁶ (SEQ ID NO: 23). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶⁵ (SEQ ID NO: 24). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶⁴ (SEQ ID NO: 25). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶³ (SEQ ID NO: 26). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶² (SEQ ID NO: 27). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶¹ (SEQ ID NO: 28). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁶⁰ (SEQ ID NO: 29). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵⁹ (SEQ ID NO: 30). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵⁸ (SEQ ID NO: 31). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵⁷ (SEQ ID NO: 32). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵⁶ (SEQ ID NO: 33). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵⁵ (SEQ ID NO: 34). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵⁴ (SEQ ID NO: 35). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵³ (SEQ ID NO: 36). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵² (SEQ ID NO: 37). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵¹ (SEQ ID NO: 38). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁵⁰ (SEQ ID NO: 39). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁴⁹ (SEQ ID NO: 40). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁴⁸ (SEQ ID NO: 41).

65 El Dominio Ib de la toxina de Cholix (aminoácidos 387-425 de la SEQ ID NO: 1) no es esencial para ninguna actividad conocida de Cholix, incluyendo la unión celular, la translocación, la retención de ER o la actividad

de ribosilación de ADP. En varias realizaciones, las moléculas de fusión que no se producen de manera natural comprenden una toxina de Cholix modificada truncada en un residuo de aminoácido dentro del dominio Ib de la toxina de Cholix, en donde la molécula de fusión tiene la capacidad de activar el receptor para la carga biológicamente activa. En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴²⁵ (SEQ ID NO: 42). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴²⁴ (SEQ ID NO: 43). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴²³ (SEQ ID NO: 44). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴²² (SEQ ID NO: 45). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴²¹ (SEQ ID NO: 46). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴²⁰ (SEQ ID NO: 47). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹⁹ (SEQ ID NO: 48). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹⁸ (SEQ ID NO: 49). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹⁷ (SEQ ID NO: 50). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹⁶ (SEQ ID NO: 51). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹⁵ (SEQ ID NO: 52). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹⁴ (SEQ ID NO: 53). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹³ (SEQ ID NO: 54). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹² (SEQ ID NO: 55). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹¹ (SEQ ID NO: 56). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴¹⁰ (SEQ ID NO: 57). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰⁹ (SEQ ID NO: 58). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰⁸ (SEQ ID NO: 59). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰⁷ (SEQ ID NO: 60). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰⁶ (SEQ ID NO: 61). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰⁵ (SEQ ID NO: 62). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰⁴ (SEQ ID NO: 63). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰³ (SEQ ID NO: 64). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰² (SEQ ID NO: 65). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰¹ (SEQ ID NO: 66). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix⁴⁰⁰ (SEQ ID NO: 67). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹⁹ (SEQ ID NO: 68). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹⁸ (SEQ ID NO: 69). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹⁷ (SEQ ID NO: 70). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹⁶ (SEQ ID NO: 71). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹⁵ (SEQ ID NO: 72). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹⁴ (SEQ ID NO: 73). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹³ (SEQ ID NO: 74). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹² (SEQ ID NO: 75). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹¹ (SEQ ID NO: 76). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁹⁰ (SEQ ID NO: 77). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸⁹ (SEQ ID NO: 78). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸⁸ (SEQ ID NO: 79). En una realización, la toxina de Cholix truncada es Cholix³⁸⁷ (SEQ ID NO: 80).

El dominio III de la toxina de Cholix (aminoácidos 426-634 de la SEQ ID NO: 1) es responsable de la citotoxicidad e incluye una secuencia de retención del retículo endoplásmico. El dominio III media la ribosilación de ADP del factor de alargamiento 2 ("EF2"), que inactiva la síntesis de proteínas. Un Cholix que "carece de actividad de ribosilación de ADP endógena" o un "Cholix desintoxicado" se refiere a cualquier Cholix descrito en la presente (incluyendo las variantes modificadas) que no comprende el dominio III de Cholix o que se ha modificado dentro del dominio III de una manera que desintoxica la molécula. Por ejemplo, la delección del residuo de ácido glutámico (Glu) en la posición de aminoácidos 581 de la SEQ ID NO: 1 desintoxica la molécula. Este Cholix desintoxicado se conoce como "Cholix ΔE581". En varias realizaciones, la porción del dominio III de Cholix distinta de la señal de retención de ER puede reemplazarse por otra secuencia de aminoácidos. Esta secuencia de aminoácidos puede ser en sí misma no inmunogénica, levemente inmunogénica o altamente inmunogénica. Es preferible un dominio de retención de ER altamente inmunogénico para su uso para provocar una respuesta inmune humoral. Por ejemplo, el dominio III de Cholix es en sí mismo altamente inmunogénico y puede usarse en moléculas de fusión donde se desea una respuesta inmune humoral robusta.

Como se usa en la presente, "una secuencia de Cholix desintoxicada" puede ser una secuencia de longitud completa o porciones de la secuencia de longitud completa. Generalmente, una secuencia de Cholix desintoxicada tiene uno o más dominios o porciones de dominios con ciertas actividades biológicas de una Cholix desintoxicada, como un dominio de reconocimiento celular, un dominio de translocación o un dominio de retención del retículo endoplásmico. Por ejemplo, una secuencia de Cholix desintoxicada puede incluir solo el dominio II y el dominio III desintoxicado. En otro ejemplo, una secuencia de Cholix desintoxicada puede incluir solo el dominio Ia, el dominio II y el dominio III desintoxicado. En otro ejemplo, una secuencia de Cholix desintoxicada puede incluir todos los dominios Ia, Ib, II y III desintoxicado. Por lo tanto, una secuencia de Cholix desintoxicada puede ser una secuencia contigua de Cholix nativo, o puede ser una secuencia compuesta por subsecuencias no contiguas del Cholix nativo que carece de actividad de ribosilación de ADP. En una realización de la presente divulgación, la molécula de fusión de origen no natural comprende una toxina de Cholix modificada mutada, designada en la presente como toxina de Cholix ΔE581, que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 81.

60 Carga biológicamente activa

Además del polipéptido de la toxina de Cholix modificado, las moléculas de fusión de la presente divulgación comprenden además una carga biológicamente activa para su administración a un sujeto. Una "carga biológicamente activa" como se usa en la presente incluye, pero no se limita a: una macromolécula, molécula pequeña, péptido, polipéptido, ácido nucleico, ARNm, miARN, ARNhc, ARNip, molécula antisentido, anticuerpo,

ADN, plásmido, vacuna, nanopartícula polimérica o material catalíticamente activo.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es una macromolécula que puede realizar una actividad biológica deseable cuando se introduce en el torrente sanguíneo del sujeto. Por ejemplo, la carga biológicamente activa puede tener actividad de unión al receptor, actividad enzimática, actividad de mensajero (es decir, actuar como una hormona, citoquina, neurotransmisor u otra molécula de señalización), actividad luminiscente u otra actividad detectable, o actividad reguladora, o cualquier combinación de las mismas. En ciertas realizaciones de diagnóstico, la carga biológicamente activa puede conjugarse con o puede ser ella misma una fracción emisora de rayos gamma farmacéuticamente aceptable, incluyendo pero no limitado a, indio y tecnecio, partículas magnéticas, materiales radiopacos como aire o bario y compuestos fluorescentes.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa de la molécula de fusión puede ejercer sus efectos en compartimentos biológicos del sujeto distintos de la sangre del sujeto. Por ejemplo, en varias realizaciones, la carga biológicamente activa puede ejercer sus efectos en el sistema linfático. En otras realizaciones, la carga biológicamente activa puede ejercer sus efectos en un órgano o tejido como, por ejemplo, el hígado, corazón, pulmones, páncreas, riñón, cerebro, médula ósea, etc. del sujeto. En tales realizaciones, la carga puede estar presente o no en la sangre, la linfa u otro fluido biológico en concentraciones detectables, pero aún puede acumularse en concentraciones suficientes en su sitio de acción para ejercer un efecto biológico.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es una proteína que comprende más de una subunidad polipeptídica. Por ejemplo, la proteína puede ser un dímero, un trímero o un multímero de orden superior. En varias realizaciones, dos o más subunidades de la proteína pueden conectarse con un enlace covalente como, por ejemplo, un enlace disulfuro. En otras realizaciones, las subunidades de la proteína pueden mantenerse juntas con interacciones no covalentes. Un experto en la técnica puede identificar rutinariamente tales proteínas y determinar si las subunidades están asociadas apropiadamente usando, por ejemplo, un inmunoensayo.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa a administrar se selecciona de, por ejemplo, citoquinas y receptores de citoquinas como Interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, factor inhibidor de linfocina, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de células madre, factor de crecimiento tumoral β , factor de necrosis tumoral, linfotóxina, Fas, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , factores de crecimiento y hormonas de proteínas como eritropoyetina, angiogenina, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento de keratinocitos, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento tumoral α , trombopoyetina, factor estimulante de la tiroides, hormona liberadora de tiroides, neurotrofina, factor de crecimiento epidérmico, VEGF, factor neurotrófico ciliar, LDL, somatomedina, factor de crecimiento de insulina, factor de crecimiento similar a la insulina I y II, quimiocinas como ENA-78, ELC, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , HRG, LEF, IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1- α , MIP-1- β , MG, MDC, NT-3, NT-4, SCF, LIF, leptina, RANTES, linfotactina, eotaxina-1, eotaxina-2, TARC, TECK, WAP-1, WAP-2, GCP-1, GCP-2; receptores de α -quimiocinas, por ejemplo, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7; y receptores de β -quimiocinas, por ejemplo, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7.

Otros ejemplos de carga biológicamente activa que pueden administrarse de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, compuestos antineoplásicos como nitrosoureas, por ejemplo, carmustina, lomustina, semustina, estrepzotocina; metilhidrazinas, por ejemplo, procarbazona, dacarbazona; hormonas esteroideas, por ejemplo, glucocorticoides, estrógenos, progestágenos, andrógenos, tetrahydrodesoxicaricosterona; compuestos inmunosupresores, por ejemplo, pirimetamina, trimetopterina, penicilamina, ciclosporina, azatioprina; e inmunostimulantes, por ejemplo, levamisol, ditiocarbamato de dietilo, encefalinas, endorfinas; compuestos antimicrobianos como antibióticos, por ejemplo, β -lactama, penicilina, cefalosporinas, carbapenims y monobactamas, inhibidores de β -lactamasa, aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, espectinomicina; antipalúdicos, amebicidas; antiprotazoarios; antifúngicos, por ejemplo, anfotericina β , antivirales, por ejemplo, aciclovir, idoxuridina, ribavirina, trifluridina, vidarbina, ganciclovir; parasiticidas; antihelmínticos; radiofármacos; fármacos gastrointestinales; compuestos hematológicos; inmunoglobulinas; proteínas de coagulación de la sangre, por ejemplo, factor antihemofílico, complejo de factor IX; anticoagulantes, por ejemplo, dicumarol, heparina Na; inhibidores de fibrolisina, por ejemplo, ácido tranexámico; fármacos cardiovasculares; fármacos antiadrenérgicos periféricos; fármacos antihipertensivos de acción central, por ejemplo, metildopa, metildopa HCl; vasodilatadores directos antihipertensivos, por ejemplo, diazóxido, hidralazina HCl; fármacos que afectan al sistema renina-angiotensina; vasodilatadores periféricos, por ejemplo, fentolamina; fármacos antianginosos; glucósidos cardíacos; inodilatadores, por ejemplo, amrinona, milrinona, enoximona, fenoximona, imazodan, sulmazol; antiarrítmicos; bloqueadores de la entrada de calcio; fármacos que afectan a los lípidos en sangre, por ejemplo, ranitidina, bosentan, rezulin; fármacos respiratorios; fármacos simpatomiméticos, por ejemplo, albuterol, mesilato de bitolterol, HCl de dobutamina, HCl de dopamina, efedrina So, epinefrina, HCl de fenfluramina, HCl de isoproterenol, HCl de metoxamina, bitartrato de norepinefrina, HCl de fenilefrina, HCl de ritodrina; fármacos colinomiméticos, por ejemplo, acetilcolina Cl; anticolinesterasas, por ejemplo, edrofonio Cl; reactivadores de colinesterasa; fármacos bloqueantes adrenérgicos, por ejemplo, acebutolol HCl, atenolol, esmolol HCl, labetalol HCl, metoprolol, nadolol,

mesilato de fentolamina, propanolol HCl; fármacos antimuscarínicos, por ejemplo, metilbromuro de anisotropina, atropina SO₄, clonidinium Br, glicopirrolato, ipratropio Br, escopolamina HBr; fármacos bloqueadores neuromusculares; fármacos despolarizantes, por ejemplo, besilato de atracurio, hexafluorenio Br, yoduro de metocurina, succinilcolina Cl, tubocurarina Cl, vecuronio Br; relajantes musculares de acción central, por ejemplo, baclofeno; neurotransmisores y agentes neurotransmisores, por ejemplo, acetilcolina, adenosina, trifosfato de adenosina; neurotransmisores de aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos excitadores, GABA, glicina; neurotransmisores de amina biogénica, por ejemplo, dopamina, epinefrina, histamina, norepinefrina, octopamina, serotonina, tiramina; neuropéptidos, óxido nítrico, toxinas de los canales de K⁺; fármacos antiparkinsonianos, por ejemplo, amaltidina HCl, mesilato de bengtropina, carbidopa; fármacos diuréticos, por ejemplo, diclorfenamida, metazolamida, bendroflumetiazida, politiazida; fármacos antimigrañosos, por ejemplo, mesilato de carboprost trometamina, maleato de metisergida.

Otros ejemplos más de carga biológicamente activa que pueden administrarse de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, hormonas como hormonas pituitarias, por ejemplo, gonadotropina coriónica, cosintropina, menotropinas, somatotropina, iorticotropina, protirelina, tirotropina, vasopresina, lipresina.; hormonas suprarrenales, por ejemplo, dipropionato de beclometasona, betametasona, dexarnetasona, triamcinolona; hormonas pancreáticas, por ejemplo, glucagón, insulina; hormona paratiroidea, por ejemplo, dihidroquisterol; hormonas tiroideas, por ejemplo, calcitonina etidronato disódico, levotiroxina Na, liotironina Na, liotrix, tiroglobulina, acetato de teriparitada; fármacos anti-tiroideos; hormonas estrogénicas; progestinas y antagonistas; anticonceptivos hormonales; hormonas testiculares; hormonas gastrointestinales, por ejemplo, colecistoquinina, enteroglicano, galanina, polipéptido inhibidor gástrico, factor de crecimiento epidérmico-uragastrona, polipéptido inhibidor gástrico, péptido liberador de gastrina, gastrinas, pentagastrina, tetrasatrina, motilina, péptido YY, secretina, péptido intestinal vasoactivo, o sincalide.

Otros ejemplos más de carga biológicamente activa que pueden administrarse de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, enzimas como hialuronidasa, estreptoquinasa, activador de plasminógeno tisular, uroquinasa, PGE-adenosina desaminasa; anestésicos intravenosos como droperidol, etomidato, citrato de fetanilo/droperidol, hexobarbital, ketamina HCl, metohexital Na, tiamilal Na, tiopental Na; anti-epilépticos, por ejemplo, carbamazepina, clonazepam, divalproex Na, etosuximida, mefeniloína, parametadiona, feniloína, primidona. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es una enzima seleccionada de hialuronidasa, estreptoquinasa, activador de plasminógeno tisular, uroquinasa, PGE-adenosina desaminasa.

Otros ejemplos más de carga biológicamente activa que pueden administrarse de acuerdo con la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos como quimioterapia o agentes antitumorales que son eficaces contra varios tipos de cánceres humanos incluyendo leucemia, linfomas, carcinomas, sarcomas, mielomas, etc. como, por ejemplo, doxorubicina, mitomicina, cisplatino, daunorrubicina, bleomicina, actinomicina D y neocarzinostatina.

Moduladores de la inflamación (interleucina-10 y citoquinas relacionadas)

La interleucina-10 (IL-10) es una importante citoquina inmunorreguladora producida por muchas poblaciones celulares y cuya principal función biológica parece ser la limitación y terminación de las respuestas inflamatorias y la regulación de la diferenciación y proliferación de varias células inmunes como las células T, células B, células asesinas naturales, células presentadoras de antígenos, mastocitos y granulocitos. Los datos más recientes sugieren que la IL-10 también media las propiedades inmunoestimuladoras que ayudan a eliminar las partículas infecciosas y no infecciosas con inflamación limitada; Asadullah et al., *Pharmacol Rev*, 55:241-269, 2003. Además, numerosas investigaciones sugieren un impacto importante de IL-10 sobre enfermedades inflamatorias, malignas y autoinmunes, y se descubrió que la sobreexpresión de IL-10 en ciertos tumores como el melanoma, el carcinoma de células basales y de células escamosas y varios linfomas; Id. Se han descubierto cinco nuevas moléculas humanas relacionadas estructuralmente con IL-10, IL-19 (Gallagher et al., *Genes Immun.*, 1:442-450, 2000); IL-20 (Blumberg et al., *Cell*, 104:9-19, 2001), IL-22 (Dumoutier et al., *Genes Immun.*, 1:488-494, 2000), IL-24 (Jiang et al., *Oncogene*, 11:2477-2486, 1995) e IL-26 (Knappe et al., *J. Virol.*, 74:3881-3887, 2000) y los datos sugieren que las células inmunes son una fuente importante de los nuevos miembros de la familia de IL-10; Wolk et al., *J. Immunol.*, 168:5397-5402, 2002.

Aunque hubo algunos resultados prometedores de la administración de IL-10 en el curso de varias enfermedades inflamatorias en modelos experimentales, varios estudios clínicos que evalúan la IL-10 como agente terapéutico para el tratamiento de trastornos inflamatorios y/o inmunes siguen siendo algo decepcionantes, con gran parte de los datos en conflicto; Asadullah et al., *Pharmacol Rev*, 55:241-269, 2003.. En general, los datos sugieren que la IL-10 es segura y generalmente bien tolerada; sin embargo, la concentración local final de IL-10 en el intestino después de la administración sistémica con dosis estándar es demasiado baja, lo que da como resultado una eficacia sólo marginal. Id. Desafortunadamente, la capacidad para aumentar suficientemente las dosis es limitada debido a los efectos secundarios (por ejemplo, anemia, dolor de cabeza), y existe la preocupación de que dosis más altas de IL-10 administrada sistémicamente puedan ser perjudiciales en lugar de útiles en ciertas indicaciones, por ejemplo, Crohn's; Herfarth et al., *Gut*, 50(2): 146-147, 2002.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un polipéptido que se ha determinado que es un modulador de la inflamación en el tracto GI seleccionado de, por ejemplo, interleucina-10, interleucina-19, interleucina-20, interleucina-22, interleucina-24, o interleucina-26.

La interleucina-10 (IL-10) se identificó por primera vez como un producto de la célula T colaboradora tipo 2 y más tarde se demostró que era producida por otros tipos de células, incluyendo las células B y los macrófagos (Moore et al., Annu Rev Immunol, 19:683- 765, 2001). También inhibe la síntesis de varias citoquinas producidas a partir de células T colaboradoras de tipo 1, como interferón γ , IL-2 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Fiorentino et al., J Immunol, 146:3444- 3451, 1991). La capacidad de la IL-10 para inhibir los moduladores de la respuesta inmunitaria mediada por células y suprimir las respuestas de las células T dependientes de las células presentadoras de antígenos demuestra que la IL-10 tiene propiedades inmunosupresoras. Esta citoquina también inhibe la producción de monocitos/macrófagos de otras citoquinas como IL-1, IL-6, IL-8, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y TNF- α .

La proteína IL-10 forma un dímero funcional que se vuelve biológicamente inactivo tras la interrupción de las interacciones no covalentes que conectan sus dos subunidades monoméricas. El extremo N-terminal no parece estar implicado directamente con la activación del receptor de IL-10. Por tanto, en un aspecto de la divulgación, se construye una molécula de fusión mediante conjugación a través del extremo N-terminal de la proteína IL-10 con el extremo C-terminal de una toxina de Cholix modificada usando un conector escindible. Tal constructo puede resultar en un dímero en solución como resultado de las interacciones de IL-10.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es interleucina-10 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82:

```
MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMM
KDQLDNNLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPPQAENQDPDIKAHVNSLGENL
KTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKI
RN (SEQ ID NO: 82)
```

o un fragmento o variante de la misma.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 82.

IL-19 una citoquina que pertenece a la subfamilia de citoquinas IL-10. Se ha descubierto que esta citoquina se expresa preferentemente en monocitos. Puede unirse al complejo del receptor de IL-20 y llevar a la activación del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) (Yamamoto-Furusho JK, et al. Hum Immunol, 72(11):1029-32, 2011). En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es interleucina-19 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 83:

```
MKLQCVSLWLLGTILILCSVDNHGLRRCLISTDMHHIEESFQEIKRAIQAKDTFPNVTILST
LETLQIIPLDVCCVTKNLLAFYVDRVFKDHQEPNPKILRKISSIANSFLYMQKTLRQCQE
QRQCHCRQEATNATRV I HDNYDQLEVHAAAIKSLGELDVFLAWINKNHEVMSSA
(SEQ ID NO: 83)
```

o un fragmento o variante de la misma.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 83.

IL-20 es una citoquina relacionada estructuralmente con la interleucina 10 (IL-10). Se ha demostrado que esta citoquina transduce su señal a través del transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3) en los queratinocitos. Se ha descubierto que un receptor específico para esta citoquina se expresa en la piel y se regula por incremento dramáticamente en la piel psoriásica, lo que sugiere un papel de esta proteína en la función epidérmica y la psoriasis (Yamamoto-Furusho JK, et al. Immunol Lett, 149(1-2):50-3 2013). En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es la interleucina-20 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la

SEQ ID NO: 84:

5 MKASSLAFSLLSAAFYLLWTPSTGLKTLNLGSCVIATNLQEIRNGFSEIRGSVQAKDGN
 DIRILRRTESLQDTKPANRCLLRHLLRLYLDRVFKNYQTPDHYTLRKISSLANSFLT
 DLRLCHAHMTCHCGEEAMK KYSQILSHFEKLEPQAAVVKALGELDILLQWMEETE
 (SEQ ID NO: 84)

10 o un fragmento o variante de la misma.

15 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 84.

20 IL-22 es una citoquina relacionada estructuralmente con la interleucina 10 (IL-10). Las células T (Th22)CD4(+) secretoras de IL-22 y la IL-22 están implicadas en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes y pueden desempeñar un papel importante en la patogenia de la NMO y la EM (Xu et al., J Neuroimmunol., Agosto 15;261(1-2):87-91, 2013). En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es interleucina-22 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 85:

25 MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLLALLVQGGAAAPISSHCRDLKSNFQQPYITNRTFML
 AKEASLADNNTDVRIGLGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQE
 VVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNA
 CI (SEQ ID NO: 85)

30 o un fragmento o variante de la misma.

35 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 85.

40 IL-24 es una citoquina relacionada estructuralmente con la interleucina 10 (IL-10) que puede inducir la apoptosis selectivamente en varias células cancerosas. La sobreexpresión de este gen lleva a una expresión elevada de varios genes de la familia GADD, que se correlaciona con la inducción de apoptosis. La fosforilación de la proteína quinasa 14 activada por mitógenos (MAPK7/P38) y la proteína 1 de choque térmico de 27 kDa (HSPB2/HSP27) son inducidas por este gen en células de melanoma, pero no en melanocitos inmortales normales (Lin BW, et al., J Korean Med Sci, 28(6):833-9, 2013). En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es interleucina-24 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 86:

45 MNFQQRLQSLWTLASRPFCPPLLATASQMOMVVLPCLGFTLLLWSQVSGAQQQEFHF
 GPCQVKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQQEVLQNVSDAESCYLEVHTLL
 EFLKTVFKNYHNRTVEVRTLKSFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRD
 SAHRRFLFRRAFKQLDVEAALTKALGEVDILLTWMQKFKYKL (SEQ ID NO: 86)

50 o un fragmento o variante de la misma.

55 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 86.

60 IL-26 se identificó por su sobreexpresión específicamente en células T transformadas con saimiri del virus del herpes. La proteína codificada es un miembro de la familia IL-10 de citoquinas. Es una proteína secretada y puede funcionar como homodímero. Se piensa que esta proteína contribuye al fenotipo transformado de las células T después de la infección por herpesvirus saimiri (Corvaisier M, et al. PLoS Biol, 10(9):e1001395, 2012). En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es interleucina-26 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 87:

65

MLVNFILRCGLLLVTLSLAIKHKQSSFTKSCYPRGTLQAVDALYIKAAWLKATIPEDRI
 KNIRLLKKKTKKQFMKNCQFQEQLLSFFMEDVFGQLQLQGCKKIRFVEDFHSRLRQKLS
 HCISCASSAREMKSITRMKRIFYRIGNKGIYKAISELDILLSWIKKLESSQ
 (SEQ ID NO: 87)

o un fragmento o variante de la misma.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 87.

Es importante destacar que las moléculas de fusión de origen no natural que carecen de un conector escindible pueden ser ventajosas porque el efecto de anclaje de la toxina de Cholix modificada por su receptor o receptores en la superficie de, por ejemplo, las células inmunitarias que también expresan el receptor de la IL -10 (pero en una cantidad considerablemente menor) puede permitir una mayor exposición de IL-10 en la superficie de las células objetivo y proporcionar un efecto sinérgico a través de la unión de Cholix a su receptor y la unión de IL-10 a la IL-10R.

Superfamilia del factor de necrosis tumoral

El factor de necrosis tumoral es una superfamilia de citoquinas en rápido crecimiento (en lo sucesivo "TNFSF") que interactúan con una superfamilia correspondiente de receptores (en lo sucesivo "TNFSFR"). Desde el descubrimiento del factor de necrosis tumoral alfa ("TNF- α ") hace aproximadamente 25 años, el TNFSF ha crecido hasta convertirse en una gran familia de proteínas relacionadas que consiste de más de 20 miembros que señala a través de más de 30 receptores (ver, por ejemplo, "Therapeutic Targets of the TNF Superfamily", editado por Iqbal S. Grewal, Landes Bioscience/Springer Science+Business Media, LLC dual imprint/Springer series: Advances in Experimental Medicine and Biology, 2009). Los miembros del TNFSF tienen una amplia distribución tisular y las interacciones ligando-receptor del TNFSF están implicadas en numerosos procesos biológicos, que varían desde la hematopoyesis hasta las respuestas celulares pleiotrópicas, incluyendo la activación, proliferación, diferenciación y apoptosis. Las interacciones ligando-receptor de TNFSF también se han implicado en tumorigénesis, rechazo de trasplantes, choque séptico, replicación viral, resorción ósea y autoinmunidad. La respuesta particular depende del receptor que está enviando señales, el tipo de célula y las señales concurrentes recibidas por la célula.

Como una serie de miembros de TNFSF se expresan en células tumorales, se están desarrollando terapias basadas en anticuerpos para dirigirse a estas moléculas y algunas se encuentran actualmente en ensayos clínicos (por ejemplo, TNF- α para uso humano en el tratamiento de sarcomas y melanomas (Eggermont et al., Lancet Oncol, 4:429-437, 2003; Lans et al., Clin Cancer Res, 7:784-790, 2001) Además, muchas de estas moléculas también se están explotando como objetivos para conjugados anticuerpo-fármaco (por ejemplo, CD30 y CD70), o explotados para radioinmunoterapia (por ejemplo, los receptores de BLYS TACI y BR3) (Buchsbaum et al., J Nucl Med, 44:434-436, 2003).

De manera similar, debido a que una serie de miembros de TNFSF han estado implicados en respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas, como la defensa contra patógenos, la respuesta inflamatoria y la autoinmunidad, se están aprovechando los enfoques para atacar muchos de los receptores y ligandos de TNFSF para el tratamiento de la autoinmunidad y otras enfermedades inflamatorias. De hecho, una serie de terapias biológicas de bloqueo del TNF (en lo sucesivo, "inhibidores del TNF") incluyendo anticuerpos monoclonales humanizados/humanos (por ejemplo, Infliximab (REMICADE®) o adalimumab (HUMIRA®)) o proteínas de fusión recombinantes de IgG y receptores solubles de TNFSF (por ejemplo, etanercept (ENBREL®)) y ahora se están usando en humanos para inhibir la inflamación asociada con la enfermedad de Crohn y la artritis reumatoide (Mitoma et al., Arthritis Rheum, 58:1248-1257, 2008; Shealy et al., Handb Exp Pharmacol, 181:101-129, 2008). Por tanto, el potencial para administrar tales agentes localmente incluyendo, pero no limitados a, la mucosa intestinal y pulmonar, proporcionaría beneficios adicionales en cuanto a eficacia y seguridad.

Aunque estos varios inhibidores del TNF han sido aprobados para terapias humanas y se están usando con éxito en pacientes humanos, sigue habiendo una serie de toxicidades asociadas con estos inhibidores del TNF, por ejemplo, hepatotoxicidad, complicaciones tromboembólicas y riesgo aumentado de desarrollo de tuberculosis y linfoma (Gardam et al., Lancet Infect Dis, 3:148-155, 2003). Además, aunque son eficaces para detener la progresión de la enfermedad, estos agentes son muy caros, generalmente se administran por vía intravenosa o subcutánea y no curan las enfermedades. El examen continuado de la transducción de señales de los miembros de TNFSF es necesario para desarrollar enfoques para intervenciones específicas de tejido, que podrían permitir que las terapias dirigidas tengan menos efectos secundarios.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un inhibidor de TNF que es un anticuerpo aislado o un fragmento de anticuerpo. Los anticuerpos aislados y los fragmentos de anticuerpos útiles en los constructos y métodos de la presente divulgación incluyen, sin limitación, Abs monoclonales (mAb), Abs policlonales, fragmentos de Ab (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fc, etc.), Abs quiméricos, mini-Abs o Abs de dominio (dAbs), Abs de doble especificidad, Abs biespecíficos, Abs heteroconjugados, Abs de cadena sencilla (SCA), fragmentos de región variable de cadena sencilla (ScFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de Ab o múltiples porciones de Ab, Abs humanizados, Abs completamente humanos y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina (Ig) que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida.

Anticuerpos anti-TNF- α . El anticuerpo anti-TNF- α aprobado por la FDA, Adalimumab (Abbvie HUMIRA®; DrugBank DB 00051) se ha usado para tratar a humanos. En varias realizaciones de la presente divulgación, la carga biológicamente activa es un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 88:

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGK
GLEWWSAITWNSGHIDYADSVERGFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
(SEQ ID NO: 88)

y la secuencia de la región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 89:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAA
STLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 89)

o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional del mismo.

En varias realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 88; y en donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o por lo menos aproximadamente el 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de la SEQ ID NO: 89; en donde el anticuerpo se une específicamente a TNF- α humano.

El anticuerpo anti-TNF- α aprobado por la FDA, Infliximab (Centocor REMICADE®; DrugBank DB 00065) se ha usado para tratar a humanos. En varias realizaciones de la presente divulgación, la carga biológicamente activa es un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno que comprende la secuencia de la región variable de la cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 90:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQA
PGKGLEWVAISFDGSNKSSADSVKGRFTUSRRNSKNALFLQM
NSLRAEDTAVFYCARDRGVSAGGNYYYYGMDVWGQGTITVTVSS
(SEQ ID NO: 90)

y la secuencia de la región variable de la cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 91:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQA
PRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTRFTLTISLLEPEDFAVYYC
QQRSNWPPFTFGPGTKVDIL (SEQ ID NO: 91)

o un fragmento de inmunoglobulina de unión a antígeno o inmunológicamente funcional del mismo.

En varias realizaciones, la divulgación proporciona anticuerpos, que comprenden una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada, y en donde la región variable de cadena pesada comprende una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 90; y en donde la cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera, y en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o por lo menos aproximadamente el 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de la SEQ ID NO: 91; en donde el anticuerpo se une específicamente a TNF- α humano.

En la bibliografía se han descrito anticuerpos contra varios otros ligandos de TNFSF o TNFSFR, y se han evaluado como candidatos terapéuticos en el tratamiento o prevención de una variedad de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes y cáncer. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de anticuerpos contra los polipéptidos de TNFSF designados o TNFSFR están fácilmente disponibles en bases de datos disponibles públicamente. Se proporciona una revisión completa de tales anticuerpos, así como de inhibidores de TNF adicionales, en "Therapeutic Targets of the TNF Superfamily", editado por Iqbal S. Grewal, Landes Bioscience/Springer Science+Business Media, LLC dual imprint/Springer series: Advances in Experimental Medicine and Biology, 2009.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un inhibidor de TNFSF que comprende un receptor soluble o un coligando soluble. Los términos "receptor soluble", "receptor soluble de citoquinas" (SCR) e "inmunoadhesina" se usan indistintamente para referirse a moléculas químicas solubles que comprenden el dominio extracelular de un receptor, por ejemplo, un receptor de un miembro de TNFSF y una secuencia de Ig, que retiene la especificidad de unión del receptor y es capaz de unirse al miembro de TNFSF. En varias realizaciones, un TNFSFSCR comprende una fusión de una secuencia de aminoácidos de TNFSFR (o una porción de la misma) de un dominio extracelular de miembro de TNFSF capaz de unirse al miembro de TNFSF (en algunas realizaciones, una secuencia de aminoácidos que retiene sustancialmente la especificidad de unión del TNFSFR) y una secuencia de Ig. Se sabe que existen dos tipos distintos de TNFSFR: TNFSFR de tipo I (TNFSFRI) y TNFSFR de tipo II (TNFSFRII). En varias realizaciones, el receptor de TNFSF es una secuencia de receptor de TNFSF humano y la fusión es con una secuencia de dominio constante de Ig. En otras realizaciones, la secuencia de dominio constante de Ig es una secuencia de dominio constante de cadena pesada de Ig. En otras realizaciones, la asociación de dos fusiones de cadena pesada de receptor de TNF-Ig (por ejemplo, mediante enlace covalente mediante enlace o enlaces disulfuro) da como resultado una estructura similar a Ig homodimérica.

Un ejemplo de un receptor soluble disponible comercialmente útil en la presente divulgación es ENBREL® (etanercept). ENBREL® consiste de la proteína de fusión dimérica TNFR-p75-Fc humana recombinante que consiste de la porción extracelular de unión al ligando del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) de 75 kilodalton (p75) humano enlazado a la porción Fc de la IgG1 humana. El componente Fc de etanercept contiene el dominio CH2, el dominio CH3 y la región bisagra, pero no el dominio CH1 de IgG1. Etanercept se produce mediante tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión de células de mamíferos de ovario de hámster chino (CHO). Consiste de 934 aminoácidos. El producto se elabora codificando el ADN de la porción soluble de TNFR-p75 humano con la porción Fc de IgG. En varias realizaciones de la presente divulgación, la carga biológicamente activa es un inhibidor de TNF que es una proteína de fusión dimérica que comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 92:

```
LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTS
DTVCDSCEDSTYTQLWNWWPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICRCPG
WYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVWCKPCAPGTFSNTTSS
TDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRSMAPGAVHLPQPVSTRSQ
HTQPTPEPSTAPSTSFLPMGSPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPPCPAPE
LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO: 92)
```

o un fragmento o variante de la misma.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el

80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 92.

5 En la Tabla 2 se proporciona una lista ilustrativa, pero no limitativa, de ligandos de TNFSF y TNFSFR adecuados de los que se derivará un inhibidor de TNF y se usará como carga biológicamente activa en los constructos y métodos de la presente divulgación.

Tabla 2

	<u>Ligandos de TNFSF</u>	<u>RefSeq (proteína)</u>
10	Factor de necrosis tumoral α ("TNF- α ")	NP_000585.2
	linfotóxina-a ("LT- α ")	NP_000586.2
	linfotóxina-p ("LT- β ")	NP_002332.1
	Ligando CD30	NP_001235.1
15	Ligando CD40	NP_000065.1
	Ligando CD70	NP_001243.1
	Ligando OX40	NP_001284491.1
	Ligando 41BB	NP_001552.2
	Ligando Apo1 (o FasL o CD95L)	NP_000630.1
20	Ligando Apo2 (o TRAIL, AIM-1 o AGP-1)	NP_001177871.1
	Ligando Apo3 (o TWEAK)	NP_003800.1
	APRIL	NP_001185551.1
	LIGHT	NP_003798.2
25	Ligando OPG (o ligando RANK)	NP_003692.1
	BlyS (o GRACIAS)	NP_001139117.1
	BCMA	NP_001183.2
	TACI	NP_036584.1
30	TNFSFR	
	TNFR1	NP_001056.1
	TNFR2	NP_001057.1
	linfotóxina- β R	NP_001257916.1
35	CD40	NP_001241.1
	CD95 (o FAS o APO-1)	NP_000034.1
	OPG	NP_002537.3
	RANK	NP_001257878.1
	CD30	NP_001234.3
40	CD27	NP_001233.1
	OX40 (o CD 134)	NP_003318.1
	41BB	NP_001552.2
	NGFR	NP_002498.1
45	BCMA	NP_001183.2
	TAC1	NP_036584.1
	EDA2R	NP_001186616.1
	TROY	NP_001191387.1
	DR6	NP_055267.1
50	DR5 (o TRAILR2)	NP_003833.4
	DR4	NP_003835.3
	DR3	NP_001034753.1
	HVEM	NP_001284534.1
55	LT β R	NP_001257916.1
	GITR	NP_004186.1
	DcR3	NP_003814
	Fn14 (o TWEAKR)	NP_057723.1
60	BAFF	NP_443177.1

Agentes reductores de glucosa

65 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un agente reductor de glucosa. En varias realizaciones, el agente reductor de glucosa es un péptido que comprende aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10, aproximadamente 11,

aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60, aproximadamente 65, aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 600, aproximadamente 700, aproximadamente 800, aproximadamente 900 o aproximadamente 1000 aminoácidos.

En la Tabla 3 se proporciona una lista ilustrativa, pero no limitativa, de proteínas adecuadas relacionadas con el metabolismo de la glucosa para ser usadas como agente reductor de glucosa en las moléculas de fusión de la presente divulgación, o de la que podrían derivarse agentes reductores de glucosa contemplados para su uso como agente reductor de glucosa.

Tabla 3

Proteínas relacionadas con el metabolismo de la glucosa	RefSeq (NCBI/Uniprot)
Proteína de glucagón	NP_002045.1
Péptido de glucagón	NP_002045.1 (aa 53-81)
Péptido 1 similar al glucagón	NP_002045.1 (aa 98-128)
Péptido 2 similar al glucagón	NP_002045.1 (aa 146-178)
Glicentina	P01275 (aa 21-89)
Polipéptido relacionado con glicentina	P01275 (aa 21-50)
Preproteína del polipéptido inhibidor gástrico	NP_004114.1
Polipéptido inhibidor gástrico	NP_004114.1 (aa 52-93)
Dipeptidil peptidasa 4	P27487
Miembro transportador de glucosa 4	NP_001033.1
Preproglucagón	AAA52567.1
Sustrato del receptor de insulina 1	NP_005535.1
Insulina	P01308
Apolipoproteína A-II	P02652
Familia de transportadores de solutos 2, miembro transportador de glucosa facilitado 1	P11166
Glucógeno sintasa 1	P13807
Glucógeno sintasa 2	P54840
No receptor de tirosina-proteína fosfatasa tipo 1	P18031
RAC-alfa serinil treonina-proteína quinasa	P31749
Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma	P37231
Hexoquinasa 3	P52790
Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa y proteína de especificidad dual	P60484
Piruvato deshidrogenasa quinasa 1	Q15118
Proteína 1 que se une al calcio y que contiene el dominio en espiral	Q9P1Z2
Proteína X similar a Max	Q9UH92
Fructosa-bisfosfato aldolasa A	P04075
Receptor del péptido 1 similar al glucagón	P43220
Receptor del péptido 2 similar al glucagón	O95838
Receptor de polipéptido inhibidor gástrico	P48546
Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1	P08069.1
Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 2	P11717.3
Receptor de insulina	P06213
Agonista de GLP-1-Exenatida	DB01276
Agonista de GLP-1-liraglutida	DB06655

El péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), un miembro de la familia de las incretinas pro-glucagón sintetizado en las células L intestinales mediante el procesamiento postraduccional específico del tejido del precursor del glucagón preproglucagón, es un potente agente reductor de glucosa implicado en el control del apetito y la saciedad. El GLP-1 actúa a través del receptor de GLP-1 (GLP-1R), que se distribuye ampliamente en los tejidos, incluyendo el cerebro, el páncreas, el intestino, los pulmones, el estómago y los riñones. Los efectos del GLP-1 parecen ser tanto

insulíntrópicos como insulínómiméticos, dependiendo de la concentración de glucosa ambiental. Debido a su capacidad para aumentar la secreción de insulina del páncreas, aumentar la sensibilidad a la insulina tanto en las células alfa como en las células beta, y disminuir la secreción de glucagón del páncreas, el GLP-1 y sus análogos han atraído una atención considerable como estrategia terapéutica para la diabetes.

5 Varios ensayos clínicos han estudiado la adición de agonistas de GLP-1 junto con la terapia de insulina en curso y se han aprobado varios agonistas de GLP-1 para el tratamiento de la T2D incluyendo, por ejemplo, exenatida (nombre comercial Byetta®, Amylin/Astrazeneca); liraglutida (nombre comercial Victoza®, Novo Nordisk A/S); lixisenatida (nombre comercial Lyxumia®, Sanofi); albiglutida (nombre comercial Tanzeum®, GlaxoSmithKline);
 10 dulaglutida (nombre comercial Trulicity®, Eli Lilly). Aunque se ha demostrado su eficacia, el principal inconveniente asociado con el uso clínico de agonistas de GLP-1 es la corta vida media biológica, que requiere la administración continua por vía intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas frecuentes, y todos los fármacos de GLP-1 aprobados hasta la fecha son administrados por vía subcutánea dos veces al día o una vez a la semana. Además, hay problemas de seguridad asociados con el uso de estos agonistas de GLP-1, concretamente, pancreatitis y neoplasia pancreática, hipoglucemia e insuficiencia renal. Otros efectos secundarios notificados incluyen trastornos gastrointestinales como dispepsia, disminución del apetito, náuseas, vómitos, dolor abdominal, diarrea, mareos, dolor de cabeza y sensación de nerviosismo. Como tal, continúa habiendo una extensa investigación dirigida a preparar análogos del GLP-1 natural que sean más duraderos, así como al desarrollo de liberación sostenida y otras tecnologías relacionadas con el propósito de reducir la frecuencia de inyecciones para los pacientes con T2D.

20 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un agonista de GLP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 93:
 HEGTFTSDLKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 93)
 o un fragmento o variante de la misma.

25 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 93.

30 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un agonista de GLP-1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 94:
 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 94)
 o un fragmento o variante de la misma.

40 En varias realizaciones, la carga biológicamente activa contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 94.

Hormona del crecimiento humano

45 La hormona del crecimiento (GH) (también conocida como somatropina o somatotropina) es la hormona principal en el cuerpo humano y es sintetizada y secretada por el sistema endocrino. Esta hormona controla funciones esenciales como: el crecimiento y la replicación de células en varios órganos del cuerpo. Algunas de las funciones esenciales de la GH incluyen: controlar el crecimiento muscular, mejorar la mineralización y la fuerza de los huesos, reducir el depósito de grasa y mantener buenos niveles de energía. La producción y secreción de la
 50 hormona del crecimiento está controlada por la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), que es secretada por el hipotálamo. La GHRH estimula la glándula pituitaria para producir GH, que se libera directamente en el torrente sanguíneo. La GH a su vez estimula al hígado para que produzca factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) que estimula la proliferación de condrocitos (células cartilagosas), promueve la diferenciación de mioblastos y mejora la síntesis de proteínas, que a su vez ayuda en el crecimiento de otros músculos y células
 55 tisulares.

60 En los Estados Unidos, la hormona del crecimiento humana (HGH) producida sintéticamente se ha usado en la población pediátrica para tratar la baja estatura debido a la deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD), el síndrome de Turner (TS), el síndrome de Noonan, el síndrome de Prader-Willi, la deficiencia del gen que contiene homeobox de estatura baja (SHOX), insuficiencia renal crónica, baja estatura idiopática y niños pequeños para la edad gestacional. En adultos, la HGH se ha utilizado para tratar el síndrome del intestino corto, una afección en la que los nutrientes no se absorben adecuadamente debido a una enfermedad intestinal grave o la extirpación quirúrgica de una gran parte del intestino delgado, la deficiencia de GH debido a tumores pituitarios raros o su
 65 tratamiento. y enfermedad de desgaste muscular asociada con el VIH/SIDA.

La deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD) es un trastorno poco común que incluye un grupo de diferentes patologías caracterizadas por la secreción inadecuada de la hormona del crecimiento (GH) desde la glándula pituitaria anterior, una pequeña glándula localizada en la base del cerebro que se encarga de la producción de varias hormonas. La GHD puede producirse por sí sola o en combinación con otras deficiencias de hormonas pituitarias. La GHD puede estar presente desde el nacimiento (congénita) o adquirirse como resultado de un trauma, infiltraciones, tumores o radioterapia. Hay una tercera categoría que no tiene causa conocida (idiopática). La GHD de inicio en la niñez puede ser de las tres: congénita, adquirida o idiopática. Da como resultado retraso en el crecimiento, baja estatura y retrasos en la maduración reflejados por el retraso del alargamiento de los huesos de las extremidades que es inadecuado para la edad cronológica del niño. La GHD de inicio en la edad adulta se adquiere con mayor frecuencia a partir de un tumor pituitario o de un traumatismo cerebral, pero también puede ser idiopática. Se caracteriza por una serie de síntomas variables que incluyen niveles reducidos de energía, composición corporal alterada, osteoporosis (densidad mineral ósea reducida), fuerza muscular reducida, anomalías de los lípidos como niveles elevados de LDL o colesterol, resistencia a la insulina y deterioro de la función cardíaca. Se ha estimado que la GHD en adultos afecta a 1 de cada 100.000 personas al año, mientras que su tasa de incidencia es de aproximadamente 2 casos por 100.000 habitantes cuando se consideran los pacientes con GHD de inicio en la niñez. Alrededor del 15-20% de los casos representan la transición de la GHD infantil a la edad adulta (Stochholm K et al., Eur J Endocrinol., 155:61-71, 2006).

El síndrome de Turner (o Ullrich-Turner) (TS) es una anomalía cromosómica caracterizada por la ausencia de todo el cromosoma X o una deleción dentro de ese cromosoma y que afecta el desarrollo en las mujeres. La característica más común del síndrome de Turner es la baja estatura, que se hace evidente alrededor de los 5 años. Esta afección se produce en aproximadamente 1 de cada 2500 niñas recién nacidas en todo el mundo, pero es mucho más común entre los embarazos que no sobreviven a término (abortos espontáneos y mortinatos). Como condición cromosómica, no hay una cura para el síndrome de Turner.

La hormona del crecimiento humana derivada del ADN recombinante es el único fármaco aprobado específicamente para el tratamiento de la GHD y el TS. A partir de 2005, varias hormonas de crecimiento humano recombinantes (también denominadas somatotropina [origen del ADNr] para inyección) disponibles en los Estados Unidos (y sus fabricantes) incluían NUTROPIN® (Genentech), HUMATROPE® (Lilly), GENOTROPIN® (Pfizer), NORDITROPIN® (Novo) y SAIZEN® (Merck Serono). En 2006, la U.S. Food and Drug Administration (FDA) aprobó una versión de rHGH llamada OMNITROPE® (Sandoz). Una forma de liberación sostenida de la hormona del crecimiento humana, NUTROPIN DEPOT® (Genentech/Alkermes) fue aprobada por la FDA en 1999, lo que permite menos inyecciones (cada 2 o 4 semanas en lugar de diarias); sin embargo, el producto fue descontinuado por Genentech/Alkermes en 2004 por razones financieras. Productos de HGH recombinantes aprobados adicionales incluyen SEROSTIM® (EMD Serono), TEV-TROPIN® (Teva) y ZORBITIVE® (Merck Serono) para el síndrome de intestino corto.

Aunque se ha demostrado que es la opción de tratamiento más eficaz, espontánea y fiable para el tratamiento de trastornos del crecimiento como la GHD, estas rHGH inyectables tienen algunas limitaciones importantes que incluyen, por ejemplo, 1) complicaciones asociadas con el uso prolongado y altas dosificaciones que son graves e irreversibles, e incluyen, por ejemplo, la probabilidad de desarrollar diabetes, trastornos cardiovasculares y cáncer de colon. Otros efectos secundarios comunes incluyen: dolor en las articulaciones, edema generalizado, dolor de cabeza grave, hipoglucemia, dolor de muñeca (síndrome del túnel carpiano), aumento del nivel de LDL en la sangre, lo que aumenta la posibilidad de desarrollar aterosclerosis, etc.; 2) las inyecciones de HGH no están disponibles sin receta, sin embargo, debido a las rígidas normas de la FDA, el mercado negro está creciendo. La obtención de inyecciones de HGH sin receta médica se considera ilegal y está penada por la ley, con pena de prisión y multa; y 3) el coste del tratamiento es exorbitante. Dependiendo de la compañía farmacéutica, el costo de las inyecciones de HGH durante un mes de tratamiento, varía típicamente de 800 \$ a 3000\$. Finalmente, los métodos convencionales que usan rHGH típicamente implican regímenes de dosis múltiples en los que la HGH se administra mediante inyección subcutánea. Las molestias, el dolor y el estigma social asociados con estos métodos pueden ser considerables. El manejo de la población pediátrica para tratar la baja estatura debido a la deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD), el síndrome de Turner (TS) y trastornos relacionados, con estas terapias altamente invasivas y repetitivas puede ser especialmente difícil.

La HGH humana de longitud completa consiste de 191 aminoácidos. La HGH producida usando técnicas de biología molecular puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica a la HGH de origen natural. Alternativamente, la HGH usada puede ser un análogo de HGH que comprende una o más variaciones en la secuencia de aminoácidos con respecto a la hormona nativa. Estas variaciones de aminoácidos pueden proporcionar una actividad biológica mejorada o algunas otras ventajas biológicas o logísticas. En varias realizaciones, la HGH recombinante comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en el N° de registro de Genbank P01241. La secuencia de aminoácidos de HGH (sin la secuencia señal de 26 aa de P01241) se expone en la SEQ ID NO: 95:

FPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFS
 ESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNV
 YDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLL
 YCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO: 95)

La HGH de la presente divulgación se refiere a HGH de cualquier fuente que tenga la secuencia de la SEQ ID NO: 95, incluyendo HGH aislada, purificada y/o recombinante producida a partir de cualquier fuente o sintetizada químicamente, por ejemplo usando síntesis en fase sólida. También se incluyen en la presente las sustituciones de aminoácidos conservadas de la HGH nativa. Por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos conservadoras, que aunque alteran la secuencia primaria de la proteína o péptido, normalmente no alteran su función. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En varias realizaciones, la HGH tiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de, por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 75%, por lo menos aproximadamente el 80%, por lo menos aproximadamente el 85%, por lo menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o por lo menos aproximadamente el 99% con la secuencia de la SEQ ID NO: 95.

En varias realizaciones, la HGH contemplada para su uso en las moléculas de fusión de la presente divulgación incluye variantes y mutantes de la hormona del crecimiento humana que se han descrito ampliamente en la técnica (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 8.637.646 (Wells et al.) y las referencias citadas en la misma, y US 20110130331 (Guyon et al.).).

En varias realizaciones, la HGH contemplada para su uso en las moléculas de fusión de la presente divulgación incluye, por ejemplo, NUTROPIN® (Genentech), HUMATROPE® (Lilly), GENOTROPIN® (Pfizer), NORDITROPIN® (Novo), SAIZEN® (Merck Serono), OMNITROPE® (Sandoz), SEROSTIM® (EMD Serono), TEVTROPIN® (Teva) y ZORBITIVE® (Merck Serono).

En la Tabla 4 se proporciona una lista ilustrativa, pero no limitativa, de proteínas de la hormona del crecimiento adecuadas para su uso como hormona del crecimiento en las moléculas de fusión de la presente divulgación, o de las que se podrían derivar las hormonas del crecimiento contempladas para su uso como hormona del crecimiento.

Tabla 4

Proteínas relacionadas con la hormona del crecimiento	RefSeq (NCBI/Uniprot)
Somatotropina	P01241
Hormona del crecimiento humano sintética	AAA72260.1
Hormona del crecimiento humano sintético parcial	CAA01435
Hormona del crecimiento humano sintético parcial	CAA00380
Hormona del crecimiento humano 2	P01242
Somatoliberina	P01286.1
Hormona reguladora del apetito	Q9UBU3
Leptina	P41159
Proteínas receptoras de hormonas de crecimiento	
Receptor de hormona del crecimiento	P10912
Receptor de hormonas liberadoras de hormonas de crecimiento	Q02643
Receptor del secretagogo de la hormona del crecimiento	Q92847
Receptores de hormonas liberadoras de hormonas de crecimiento forma a	P78470
Receptor de hormona del crecimiento	E9PCN7

Sitio de inserción para la unión de la carga biológicamente activa

La carga biológicamente activa de la molécula de fusión puede unirse al resto de la molécula de fusión mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica sin limitación. La carga biológicamente activa puede introducirse en cualquier porción de la molécula de fusión que no altere la actividad de unión a células o transcritos de la toxina de Cholix modificada. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa se acopla directamente al extremo N-terminal o al extremo C-terminal de la toxina de Cholix modificada. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa puede conectarse con una cadena lateral de un aminoácido de la toxina de Cholix modificada. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa se acopla al Cholix modificado con un conector peptídico no escindible. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa se acopla a la toxina de Cholix modificada con un conector escindible de tal manera que la escisión en el conector o conectores

escindibles separa la carga biológicamente activa del resto de la molécula de fusión. En varias realizaciones, la carga biológicamente activa es un polipéptido que también puede comprender un péptido líder corto que permanece unido al polipéptido después de la escisión del conector escindible. Por ejemplo, la carga biológica activa puede comprender un péptido líder corto de más de 1 aminoácido, más de 5 aminoácidos, más de 10 aminoácidos, más de 15 aminoácidos, más de 20 aminoácidos, más de 25 aminoácidos, más de 30 aminoácidos, más de 50 aminoácidos o más de 100 aminoácidos. En algunos casos, la carga biológica activa puede comprender un péptido líder corto de menos de 100 aminoácidos, menos de 50 aminoácidos, menos de 30 aminoácidos, menos de 25 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos, menos de 15 aminoácidos, menos de 10 aminoácidos ácidos, o menos de 5 aminoácidos. En algunos casos, la carga biológica activa puede comprender un péptido líder corto de entre 1 y 100 aminoácidos, entre 5 y 10 aminoácidos, entre 10 y 50 aminoácidos o entre 20 y 80 aminoácidos. En la toxina de Cholix nativa, el giro del dominio lb abarca los aminoácidos 387 a 425 y se caracteriza estructuralmente por un enlace disulfuro entre dos cisteínas en las posiciones 395 y 402. Esta porción del dominio lb de la toxina de Cholix no es esencial para ninguna actividad conocida de la toxina de Cholix., incluyendo la unión celular, la translocación, la retención de ER o la actividad de ribosilación de ADP. Por consiguiente, el dominio lb puede eliminarse por completo o modificarse para contener una carga biológicamente activa. Por tanto, en varias realizaciones, la carga biológicamente activa puede insertarse en el dominio lb de la toxina de Cholix. Si es deseable, la carga biológicamente activa puede insertarse en el dominio lb de la toxina de Cholix entre las cisteínas en las posiciones 395 y 402 que no están reticuladas. Esto puede lograrse reduciendo el enlace disulfuro entre las cisteínas, eliminando una o ambas cisteínas completamente del dominio lb, mutando una o ambas cisteínas en otros residuos, por ejemplo, serina, o mediante otras técnicas similares. Alternativamente, la carga biológicamente activa puede insertarse en el giro del dominio lb entre las cisteínas en las posiciones 395 y 402. En tales realizaciones, puede usarse el enlace disulfuro entre las cisteínas para restringir el dominio de la carga biológicamente activa.

En realizaciones en las que la carga biológicamente activa se expresa junto con otra porción de la molécula de fusión como una proteína de fusión, la carga biológicamente activa puede insertarse en la molécula de fusión mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica sin limitación. Por ejemplo, los aminoácidos correspondientes a la carga biológicamente activa pueden insertarse directamente en la molécula de fusión, con o sin delección de las secuencias de aminoácidos nativas. En varias realizaciones, todo o parte del dominio lb de la toxina de Cholix puede eliminarse y reemplazarse con la carga biológicamente activa. En varias realizaciones, los residuos de cisteína del giro lb se eliminan de tal manera que la carga biológicamente activa permanece sin restricciones. En otras realizaciones, los residuos de cisteína del giro lb están enlazados con un enlace disulfuro y restringen la carga biológicamente activa.

En realizaciones en las que la carga biológicamente activa no se expresa junto con el resto de la molécula de fusión como una proteína de fusión, la carga biológicamente activa puede conectarse con el resto de la molécula de fusión mediante cualquier método adecuado conocido por un experto en la técnica, sin limitación. Más específicamente, los métodos ejemplares descritos anteriormente para conectar un dominio de unión al receptor al resto de la molécula son igualmente aplicables para conectar la carga biológicamente activa al resto de la molécula.

40 **Producción de proteínas de fusión**

En varias realizaciones, la molécula de fusión que no se produce de manera natural se sintetiza usando la metodología de ADN recombinante. Generalmente, esto implica crear una secuencia de ADN que codifica la molécula de fusión, colocar el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar la molécula en un huésped, aislar la molécula expresada y, si es necesario, volver a naturalizar la molécula.

El ADN que codifica las moléculas de fusión (por ejemplo, Cholix⁴¹⁵-IL-10) descritas en la presente puede prepararse mediante cualquier método adecuado incluyendo, por ejemplo, la clonación y restricción de secuencias apropiadas o síntesis química directa mediante métodos como el método de fosfotriéster de Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:90-99; el método de fosfodiéster de Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68:109-151; el método de dietilfosoramidita de Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862; el método de soporte sólido de la Patente de Estados Unidos N° 4.458.066, y similares.

La síntesis química produce un oligonucleótido de cadena sencilla. Este puede convertirse en ADN de cadena doble mediante hibridación con una secuencia complementaria o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena sencilla como plantilla. Un experto reconocería que, aunque la síntesis química de ADN está limitada a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas mediante ligación de secuencias más cortas.

Alternativamente, pueden clonarse subsecuencias y escindirse las subsecuencias apropiadas usando enzimas de restricción apropiadas. Luego, los fragmentos pueden ligarse para producir la secuencia de ADN deseada.

En varias realizaciones, el ADN que codifica las moléculas de fusión de la presente divulgación puede clonarse usando métodos de amplificación de ADN como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así, por

ejemplo, el gen para IL-10 se amplifica por PCR, usando un cebador de sentido que contiene el sitio de restricción para, por ejemplo, NdeI y un cebador antisentido que contiene el sitio de restricción para HindIII. Esto puede producir un ácido nucleico que codifica la secuencia de IL-10 madura y que tiene sitios de restricción terminales. Una toxina de Cholix modificada que tiene sitios de restricción "complementarios" puede clonarse de manera similar y luego ligarse a la IL-10 y/o a un conector unido a la IL-10. La ligación de las secuencias de ácidos nucleicos y la inserción en un vector produce un vector que codifica la IL-10 unida a la toxina de Cholix modificada.

Conectores no escindibles

En varias realizaciones, la toxina de Cholix modificada y la carga biológicamente activa pueden separarse mediante un espaciador de péptidos que consiste de uno o más aminoácidos (por ejemplo, hasta 25 aminoácidos). Generalmente, el espaciador no tendrá ninguna actividad biológica específica que no sea la de unir las proteínas o conservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, en varias realizaciones, los aminoácidos constituyentes del espaciador pueden seleccionarse para influir en alguna propiedad de la molécula, como el plegamiento, la carga neta o la hidrofobicidad.

En varias realizaciones, el conector es capaz de formar enlaces covalentes tanto con la toxina de Cholix como con la carga biológicamente activa. Los conectores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, conectores de carbono de cadena lineal o ramificada, conectores de carbono heterocíclicos o conectores peptídicos. En varias realizaciones, el conector o conectores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes de la toxina de Cholix y/o la carga biológicamente activa a través de sus grupos laterales (por ejemplo, a través de un enlace disulfuro a cisteína). En varias realizaciones, los conectores se unen a los grupos amino y/o carboxilo de carbono alfa de los aminoácidos terminales de la toxina de Cholix y/o la carga biológicamente activa.

Puede usarse un conector bifuncional que tiene un grupo funcional reactivo con un grupo de la toxina de Cholix y otro grupo reactivo en la carga biológicamente activa, para formar el conjugado deseado. Alternativamente, la derivatización puede implicar un tratamiento químico de la fracción de direccionamiento. Se conocen procedimientos para la generación de, por ejemplo, grupos sulfhidrilo libres en polipéptidos, como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (ver Patente de Estados Unidos N° 4.659.839).

Se conocen muchos procedimientos y moléculas conectoras para la unión de varios compuestos que incluyen quelatos de radionúclidos metálicos, toxinas y fármacos a proteínas como anticuerpos. Ver, por ejemplo, Solicitud de Patente Europea N° 188,256; Patentes de Estados Unidos N° 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338; 4.569.789; y 4.589.071; y Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47:4071-4075.

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa que se administrará al sujeto se acopla a la toxina de Cholix modificada usando uno o más conectores peptídicos no escindibles que comprenden, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos GGGGS (SEQ ID NO: 96), GGGSGGGGS (SEQ ID NO: 97), GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 98), o GGGSGGG (SEQ ID NO: 99), en donde la toxina de Cholix modificada dirige dicha carga biológicamente activa a células específicas incluyendo, pero no limitadas a, células del sistema inmunitario como macrófagos, células presentadoras de antígenos y células dendríticas.

Conectores divisibles

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa que se va a administrar al sujeto se acopla a la toxina de Cholix modificada usando uno o más conectores escindibles. El número de conectores escindibles presentes en la molécula de fusión depende, por lo menos en parte, de la localización de la carga biológicamente activa con respecto a la toxina de Cholix modificada y de la naturaleza de la carga biológicamente activa. Cuando la carga biológicamente activa puede separarse del resto de la molécula de fusión con escisión en un solo conector, las moléculas de fusión pueden comprender un solo conector escindible. Además, cuando la carga biológicamente activa es, por ejemplo, un dímero u otro multímero, cada subunidad de la carga biológicamente activa puede separarse del resto de la molécula de fusión y/o las otras subunidades de la carga biológicamente activa mediante escisión en un conector escindible.

En varias realizaciones, los conectores escindibles pueden escindirse mediante una enzima de escisión que está presente en o cerca de la membrana basolateral de una célula epitelial. Seleccionando el conector escindible a ser escindido por tales enzimas, la carga biológicamente activa puede liberarse del resto de la molécula de fusión después de la transcitosis a través de la membrana mucosa y liberarse desde la célula epitelial en la matriz celular en el lado basolateral de la membrana. Además, podrían usarse enzimas de escisión que están presentes dentro de la célula epitelial, de tal manera que el conector escindible se escinde antes de la liberación de la molécula de fusión desde la membrana basolateral, siempre que la enzima de escisión no escinda la molécula de fusión antes de que la molécula de fusión se introduzca en la vía de transporte en la célula epitelial polarizada que da como resultado la liberación de la molécula de fusión y la carga biológicamente activa desde la membrana basolateral de la célula.

En varias realizaciones, la enzima que está presente en una membrana basolateral de una célula epitelial polarizada se selecciona de, por ejemplo, catepsina GI, quimotripsina I, elastasa I, subtilisina AI, subtilisina All, trombina I o uroquinasa I. La tabla 5 presenta estas enzimas junto con una secuencia de aminoácidos que es reconocida y escindida por la peptidasa particular.

Tabla 5

Las peptidasas se presentan cerca de las membranas de mucosa basolaterales o en los últimos aspectos de la vía de la transcitosis	
Peptidasa	Secuencia de aminoácidos escindida
Catepsina GI	AAPF (SEQ ID NO: 100)
Quimotripsina I	GGF (SEQ ID NO: 101)
Elastasa I	AAPV (SEQ ID NO: 102)
Subtilisina AI	GGL (SEQ ID NO: 103)
Subtilisina All	AAL (SEQ ID NO: 104)
Trombina I	FVR (SEQ ID NO: 105)
Uroquinasa I	VGR (SEQ ID NO: 106)
Furina	RKPR (SEQ ID NO: 107)

En varias realizaciones, el conector escindible muestra una mayor propensión a la escisión que el resto del constructo de administración. Como sabrá un experto en la técnica, muchas secuencias de péptidos y polipéptidos pueden escindirse mediante peptidasas y proteasas. En varias realizaciones, el conector escindible se selecciona para que se escinda preferentemente con respecto a otras secuencias de aminoácidos presentes en el constructo de administración durante la administración del constructo de administración. En varias realizaciones, el dominio de unión al receptor está sustancialmente (por ejemplo, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80% o aproximadamente el 75%) intacto después de la administración del constructo de administración al torrente sanguíneo del sujeto. En varias realizaciones, el dominio de translocación es sustancialmente (por ejemplo, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80%, o aproximadamente el 75%) intacto después de la administración del constructo de administración al torrente sanguíneo del sujeto. En varias realizaciones, la macromolécula está sustancialmente (por ejemplo, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80% o aproximadamente el 75%) intacta después de la administración del constructo de administración al torrente sanguíneo del sujeto. En varias realizaciones, el conector escindible se escinde sustancialmente (por ejemplo, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 80% o aproximadamente el 75%) después de la administración del constructo de administración al torrente sanguíneo del sujeto.

En otras realizaciones, el conector escindible se escinde mediante una enzima de escisión que se encuentra en el plasma del sujeto. Puede usarse cualquier enzima de escisión que un experto en la técnica sepa que está presente en el plasma del sujeto para escindir el conector escindible. Los usos de tales enzimas para escindir los conectores escindibles es menos preferido que el uso de enzimas escindibles que se encuentran cerca de la membrana basolateral de una célula epitelial polarizada porque se cree que se producirá una escisión más eficaz cerca de la membrana basolateral. Sin embargo, si el experto en la técnica determina que la escisión mediada por una enzima plasmática es suficientemente eficaz para permitir la escisión de una fracción suficiente de los constructos de suministro para evitar efectos adversos, pueden usarse tales enzimas de escisión del plasma para escindir las constructos de administración. Por consiguiente, en varias realizaciones, el conector escindible puede escindirse con una enzima que se selecciona del grupo que consiste de caspasa-1, caspasa-3, proproteína convertasa 1, proproteína convertasa 2, proproteína convertasa 4, proproteína convertasa 4 PACE, propil oligopeptidasa, enzima de escisión de endotelina, dipeptidil-peptidasa IV, peptidasa señal, neprilisina, renina, y esterasa (ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.673.574). La Tabla 6 presenta estas enzimas junto con una secuencia o secuencias de aminoácidos reconocidas por la peptidasa particular. La peptidasa escinde un péptido que comprende estas secuencias en el lado N-terminal del aminoácido identificado con un asterisco.

Tabla 6

Peptidasas plasmáticas

Peptidasa	Secuencia de aminoácidos escindida
Caspasa-1	Tyr-Val-Ala-Asp-Xaa* (SEQ ID NO: 108)
Caspasa-3	Asp-Xaa-Xaa-Asp-Xaa* (SEQ ID NO: 109)
Proproteína convertasa 1	Arg-(Xaa) _n -Arg-Xaa*; n = 0, 2, 4 o 6 (SEQ ID NO: 110)
Proproteína convertasa 2	Lys-(Xaa) _n -Arg-Xaa*; n = 0, 2, 4 o 6 (SEQ ID NO: 111)

(continuación)
Peptidasas plasmáticas

	Peptidasa	Secuencia de aminoácidos escindida
5	Proteína convertasa 4 Proteína convertasa 4 PACE 4	Glu-Arg-Thr-Lys-Arg-Xaa* (SEQ ID NO: 112) Arg-Val-Arg-Arg-Xaa* (SEQ ID NO: 113) Decanoil-Arg-Val-Arg-Arg-Xaa* (SEQ ID NO: 114)
10	Enzima de escisión de proliloligopeptidasa endotelina en combinación con dipeptidil-peptidasa IV Peptidasa señal Nepirilisina en combinación con dipeptidil-peptidasa IV	Pro-Xaa*-Trp-Val-Pro-Xaa (SEQ ID NO: 115) Trp-Val*-Ala-Xaa (SEQ ID NO: 116) Xaa-Phe*-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 117) Xaa-Tyr*-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 118) Xaa-Trp*-Xaa-Xaa (SEQ ID NO: 119)
15	Renina en combinación con dipeptidil-peptidasa IV	Asp-Arg-Tyr-Ile-Pro-Phe-His-Leu*-Leu (Val, Ala or Pro)-Tyr-(Ser, Pro, or Ala) (SEQ ID NO: 120)

20 Por tanto, en varias realizaciones, el conector escindible puede ser cualquier conector escindible que un experto en la técnica sabe que puede escindir mediante una enzima que está presente en la membrana basolateral de una célula epitelial. En varias realizaciones, el conector escindible comprende un péptido. En otras realizaciones, el conector escindible comprende un ácido nucleico, como ARN o ADN. En otras realizaciones más, el conector escindible comprende un carbohidrato, como un disacárido o un trisacárido.

25 Alternativamente, en varias realizaciones, el conector escindible puede ser cualquier conector escindible que sabe un experto en la técnica que puede escindir mediante una enzima que está presente en el plasma del sujeto al que se administra el constructo de administración. En varias realizaciones, el conector escindible comprende un péptido. En otras realizaciones, el conector escindible comprende un ácido nucleico, como ARN o ADN. En otras realizaciones más, el conector escindible comprende un carbohidrato, como un disacárido o un trisacárido.

35 En varias realizaciones, las peptidasas muestran un aumento de actividad mucho mayor (por ejemplo, del 100%, 200% o más con respecto al lado apical) en el lado basolateral (también denominado basolateral). Por tanto, en varias realizaciones, el conector escindible puede escindir mediante una enzima que muestra una actividad 50% mayor en el lado basolateral de la membrana que en el lado apical de la membrana. En varias realizaciones, el conector escindible es escindible por una enzima que muestra una actividad un 100% mayor en el lado basolateral de la membrana que en el lado apical de la membrana. En varias realizaciones, el conector escindible es escindible mediante una enzima que muestra una actividad un 200% mayor en el lado basolateral de la membrana que en el lado apical de la membrana. En varias realizaciones, el conector escindible es escindible por una enzima que muestra una actividad un 500% mayor en el lado basolateral de la membrana que en el lado apical de la membrana. En varias realizaciones, el conector escindible es escindible por una enzima que muestra una actividad un 1000% mayor en el lado basolateral de la membrana que en el lado apical de la membrana.

45 En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende un conector escindible que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 o SEQ ID NO: 107 y es escindible por una enzima que muestra mayor actividad en el lado basolateral de una célula epitelial polarizada que en el lado apical de la célula epitelial polarizada, y/o es escindible por una enzima que muestra mayor actividad en el plasma que en el lado apical de una célula epitelial polarizada.

50 En varias realizaciones, el conector escindible puede ser un conector escindible que se escinde después de un cambio en el entorno de la molécula de fusión. Por ejemplo, el conector escindible puede ser un conector escindible que es sensible al pH y se escinde por un cambio en el pH que se experimenta cuando la molécula de fusión se libera de la membrana basolateral de una célula epitelial polarizada. Por ejemplo, la luz intestinal es fuertemente alcalina, mientras que el plasma es esencialmente neutro. Por tanto, un conector escindible puede ser una fracción que se escinde tras un cambio de pH alcalino a neutro. El cambio en el entorno de la molécula de fusión que escinde el conector escindible puede ser cualquier cambio ambiental que se experimenta cuando la molécula de fusión se libera de la membrana basolateral de una célula epitelial polarizada conocida por un experto en la técnica, sin limitación.

60 En varias realizaciones, el conector escindible se escinde por una enzima de escisión que se encuentra en el plasma del sujeto. Puede usarse cualquier enzima de escisión que un experto en la técnica sepa que está presente en el plasma del sujeto para escindir el conector escindible. Por consiguiente, en varias realizaciones, el conector escindible puede escindir con una enzima que se selecciona de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 108, SEQ

ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119 o SEQ ID NO: 120.

5 En varias realizaciones, el conector escindible es un conector que contiene una secuencia de aminoácidos que es un sustrato conocido para la proteasa del virus del grabado del tabaco (TEV). Por consiguiente, en varias realizaciones, el conector escindible comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en, por ejemplo, GGGGSGGGENLYFQS (SEQ ID NO: 121).

10 **Conjugación química de la carga con la toxina de Cholix modificada**

En varias realizaciones, la carga biológicamente activa que se va a administrar al sujeto se conjuga químicamente con la toxina de Cholix modificada. Los expertos en la técnica conocen bien los medios para conjugar químicamente moléculas.

15 El procedimiento para conjugar dos moléculas varía de acuerdo con la estructura química del agente. Los polipéptidos contienen típicamente una variedad de grupos funcionales; por ejemplo, grupos ácido carboxílico (COOH) o amina libre ($-NH_2$), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en el otro péptido, o sobre un conector para unirse a las moléculas de la misma.

20 Alternativamente, el anticuerpo y/o la carga biológicamente activa pueden derivatizarse para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas conectoras como las disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford III.

25 En varias realizaciones, las toxinas de Cholix modificadas aisladas se preparan mediante fermentación bacteriana y se purifican mediante métodos establecidos. La toxina de Cholix modificada purificada se modifica luego en su extremo C-terminal para permitir el acoplamiento químico directo a través de un residuo de sulfhidrilo libre localizado cerca del extremo C-terminal de la proteína. La modificación C-terminal incluye un giro restringido por cisteína que alberga la secuencia de escisión de consenso para la proteasa altamente selectiva del virus del grabado del tabaco (TEV), una segunda cisteína y una etiqueta de hexahistadina (His₆). La segunda Cys se incluye para formar un puente de disulfuro con la Cys usada en última instancia para el acoplamiento. Añadir la secuencia His₆ a la proteína simplifica la purificación y la secuencia de escisión de TEV proporciona un mecanismo para eliminar selectivamente el residuo Cys terminal después de una reducción suave. La escisión de TEV y la reducción leve con ditioteitol 0,1 mM después de la expresión y el aislamiento de los constructos ntCholix permiten el acoplamiento químico directo de una carga biológicamente activa a través de una reacción basada en maleimida como un mecanismo genérico de unión de carga. Después de la escisión, reducción y acoplamiento de carga de la proteasa TEV a través de una reacción de maleimida con el sulfhidrilo libre, se logró la eliminación de la secuencia C-terminal liberada mediante un segundo paso de cromatografía en columna de Ni²⁺.

40 En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende partículas que están decoradas covalentemente con la toxina de Cholix modificada, y en donde la carga biológicamente activa está integrada en las partículas. En varias realizaciones, las partículas pueden ser más pequeñas de ~150 nm de diámetro, más pequeñas de ~100 nm o más pequeñas de ~50 nm.

45 En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una carga biológicamente activa acoplada de manera no covalente a la toxina de Cholix modificada. Esta molécula de fusión podría transportar, por ejemplo, una IL-10 asociada no covalentemente a través del epitelio, como un elemento de superficie del receptor de IL-10 (Josephson, K., Logsdon, NJ, Walter, MR, Immunity 15:35-46, 2001).

50 **Composiciones farmacéuticas y métodos de administración**

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se refieren a composiciones para la administración a un sujeto humano. Las composiciones farmacéuticas comprenden las moléculas de fusión de origen no natural citadas en la presente, solas o en combinación. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender moléculas adicionales capaces de alterar las características de las moléculas de fusión de origen no natural, por ejemplo, estabilizar, modular y/o activar su función. La composición puede, por ejemplo, estar en forma sólida o líquida y puede estar, entre otras cosas, en forma de un polvo o polvos, un comprimido o comprimidos, una solución o soluciones o (un) aerosol o aerosoles. La composición farmacéutica de la presente divulgación puede, opcional y adicionalmente, comprender un portador farmacéuticamente aceptable. "Portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material encapsulante sólido, semisólido o líquido no tóxico y cualquiera de los portadores, vehículos, tampones y excipientes farmacéuticos estándar como una solución salina tamponada con fosfato, una solución acuosa al 5% de dextrosa, y emulsiones como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y varios tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes.

65 Las composiciones farmacéuticas se formulan generalmente apropiadamente para el uso inmediato previsto para la molécula de fusión. Por ejemplo, si la molécula de fusión no se va a administrar inmediatamente, la

molécula de fusión puede formularse en una composición adecuada para el almacenamiento. Una de tales composiciones es una preparación liofilizada de la molécula de fusión junto con un estabilizante adecuado. Alternativamente, la composición de la molécula de fusión puede formularse para su almacenamiento en una solución con uno o más estabilizantes adecuados. Puede usarse cualquier estabilizante conocido por un experto en la técnica sin limitación. Por ejemplo, los estabilizantes adecuados para preparaciones liofilizadas incluyen, pero no se limitan a, azúcares, sales, surfactantes, proteínas, agentes caotrópicos, lípidos y aminoácidos. Los estabilizantes adecuados para preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, azúcares, sales, surfactantes, proteínas, agentes caotrópicos, lípidos y aminoácidos. Los estabilizantes específicos que pueden usarse en las composiciones incluyen, pero no se limitan a, trehalosa, albúmina sérica, fosfatidilcolina, lecitina y arginina. Otros compuestos, composiciones y métodos para estabilizar una preparación liofilizada o líquida de las moléculas de fusión pueden encontrarse, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N^o 6.573.237, 6.525.102, 6.391.296, 6.255.284, 6.133.229, 6.007.791, 5.997.856, y 5.917.021.

En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se formulan para administración oral. Las composiciones farmacéuticas formuladas para administración oral aprovechan la capacidad de la toxina de Cholix modificada para mediar en la transcitosis a través del epitelio gastrointestinal (GI). Se prevé que la administración oral de estas composiciones farmacéuticas dará como resultado la absorción de la molécula de fusión a través de células epiteliales polarizadas de la mucosa digestiva, por ejemplo, la mucosa intestinal, seguida de la liberación de la carga biológicamente activa en el lado basolateral de la membrana de mucosa. En varias realizaciones, la célula epitelial se selecciona del grupo que consiste de células epiteliales nasales, células epiteliales orales, células epiteliales intestinales, células epiteliales rectales, células epiteliales vaginales, y células epiteliales pulmonares. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden incluir la adición de un potenciador de la transcitosis para facilitar la transferencia de la proteína de fusión a través del epitelio GI. Tales potenciadores son conocidos en la técnica. Ver Xia et al., (2000) *J. Pharmacol. Experimentar. Therap.*, 295:594-600; y Xia et al. (2001) *Pharmaceutical Res.*, 18(2):191-195.

Se prevé que una vez transportadas a través del epitelio GI, las moléculas de fusión de la divulgación mostrarán una vida media prolongada en suero, es decir, la carga biológicamente activa de las moléculas de fusión mostrará una vida media en suero prolongada en comparación con la carga biológicamente activa en su estado no fundido. Como tales, las formulaciones orales de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se preparan de tal manera que sean adecuadas para el transporte al epitelio GI y la protección de la molécula de fusión en el estómago. Tales formulaciones pueden incluir componentes portadores y dispersantes y pueden estar en cualquier forma adecuada, incluyendo aerosoles (para administración oral o pulmonar), jarabes, elixires, comprimidos, incluyendo comprimidos masticables, cápsulas duras o blandas, grageas, pastillas, suspensiones acuosas o aceitosas, emulsiones, obleas o gránulos granulados, y polvos dispersables. En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas se emplean en formas de dosificación sólidas, por ejemplo, comprimidos, cápsulas o similares, adecuadas para la administración oral simple de dosificaciones precisas.

En varias realizaciones, la formulación oral comprende una molécula de fusión y uno o más compuestos que pueden proteger la molécula de fusión mientras está en el estómago. Por ejemplo, el compuesto protector debería poder prevenir la hidrólisis ácida y/o enzimática de la molécula de fusión. En varias realizaciones, la formulación oral comprende una molécula de fusión y uno o más compuestos que pueden facilitar el tránsito del constructo desde el estómago al intestino delgado. En varias realizaciones, el uno o más compuestos que pueden proteger la molécula de fusión de la degradación en el estómago también pueden facilitar el tránsito del constructo desde el estómago al intestino delgado. Por ejemplo, la inclusión de bicarbonato de sodio puede ser útil para facilitar el movimiento rápido de los materiales administrados por vía intragástrica desde el estómago al duodeno como se describe en Mrsny et al., *Vaccine* 17:1425-1433, 1999. Otros métodos para formular composiciones de tal manera que las moléculas de fusión puedan pasar a través del estómago y entrar en contacto con las membranas epiteliales polarizadas en el intestino delgado incluyen, pero no se limitan a, tecnologías de recubrimiento entérico como se describe en DeYoung, *Int J Pancreatol*, 5 Suppl:31- 6, 1989 y los métodos proporcionados en las Patentes de Estados Unidos N^o 6.613.332, 6.174.529, 6.086.918, 5.922.680, y 5.807.832.

Las composiciones farmacéuticas destinadas a uso oral pueden prepararse de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas y tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste de agentes edulcorantes para proporcionar una preparación farmacéuticamente elegante y agradable al paladar. Por ejemplo, para preparar comprimidos que se administran por vía oral, la molécula de fusión se mezcla con por lo menos un excipiente farmacéutico y la formulación sólida se comprime para formar un comprimido de acuerdo con métodos conocidos, para su administración al tracto gastrointestinal. La composición de comprimido se formula típicamente con aditivos, por ejemplo, un sacárido o un portador de celulosa, un aglutinante como pasta de almidón o metilcelulosa, un relleno, un disgregador, u otros aditivos típicamente usados en la fabricación de preparaciones médicas. Para preparar cápsulas administrables por vía oral, se mezcla DHEA con por lo menos un excipiente farmacéutico y la formulación sólida se coloca en un recipiente capsular adecuado para su administración al tracto gastrointestinal. Las composiciones que comprenden moléculas de fusión pueden prepararse como se describe generalmente en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18^a ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton Pa. 18042) en el Capítulo 89.

En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan como comprimidos administrables por vía oral que contienen moléculas de fusión mezcladas con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser diluyentes inertes como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato cálcico o fosfato sódico; agentes de granulación y de disgregación, por ejemplo, almidón de maíz, gelatina o goma arábiga, y agentes lubricantes, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse con técnicas conocidas para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar de este modo una acción sostenida durante un período de tiempo más largo. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo de tiempo como monoestearato de glicerol o diestearato de glicerilo solo con una cera.

En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas se formulan como cápsulas de gelatina dura en donde la molécula de fusión se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato cálcico o caolín o como cápsulas de gelatina blanda en las que la molécula de fusión se mezcla con un medio acuoso u oleoso, por ejemplo, aceite de araquís, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva.

En varias realizaciones, las suspensiones acuosas pueden contener una molécula de fusión en la mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de etileno con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadeciletiloxicetatanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes y uno o más agentes edulcorantes como sacarosa o sacarina.

En varias realizaciones, las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo la molécula de fusión en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de araquís, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral como parafina líquida. Las suspensiones de aceite pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Pueden añadirse agentes edulcorantes como los expuestos anteriormente, y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación oral agradable. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante como el ácido ascórbico.

En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de araquís, o un aceite mineral, por ejemplo, goma de acacia o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo, lecitina de soja, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de los mismos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán. Las emulsiones también pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

En varias realizaciones en las que la composición farmacéutica está en forma de comprimido o cápsula, el comprimido o cápsula se recubre o encapsula para proteger la carga biológicamente activa de la acción enzimática en el estómago y para asegurar que haya suficiente carga biológicamente activa para ser absorbida por el sujeto para producir una respuesta eficaz. Tales métodos de recubrimiento o encapsulación incluyen, por ejemplo, encapsulación en nanopartículas compuestas de polímeros con una estructura principal hidrófoba y ramas hidrófilas como portadores de fármacos, encapsulación en micropartículas, inserción en liposomas en emulsiones y conjugación con otras moléculas. Los ejemplos de nanopartículas incluyen nanopartículas mucoadhesivas recubiertas con quitosano y Carbopol (Takeuchi et al., Adv. Drug Deliv. Rev.47(1):39-54, 2001) y nanopartículas que contienen poliésteres de combinación cargados, poli(2-sulfobutil-alcohol vinílico) y poli(ácido D,L-láctico-co-glicólico) (Jung et al., Eur. J. Pharm. Biopharm. 50(1):147-160, 2000).

Pueden usarse comprimidos encapsulados o recubiertos que liberen la carga biológicamente activa de una manera capa por capa, liberando de este modo la carga biológicamente activa durante un período de tiempo predeterminado mientras se desplazan a lo largo del tracto gastrointestinal. Además, los comprimidos que comprenden la carga biológicamente activa pueden colocarse dentro de un comprimido más grande, protegiendo de este modo el comprimido interno de las condiciones ambientales y de procesamiento como temperatura, agentes químicos (por ejemplo, solventes), pH y humedad. El comprimido exterior y los recubrimientos sirven además para proteger la carga biológicamente activa en el entorno gástrico.

En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración oral usando microesferas de poliéster, microesferas de zeína, microesferas proteínoides, microesferas de

policianoacrilato y sistemas basados en lípidos (ver, por ejemplo, DiBase y Morrel, Oral Delivery of Microencapsulated Proteins, in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders y Hendren (eds.), páginas 255-288 (Plenum Press 1997)).

5 Los agentes activos de superficie o surfactantes promueven la absorción de polipéptidos a través de la membrana o el revestimiento mucosal. Los agentes activos de superficie o surfactantes útiles incluyen ácidos grasos y sales de los mismos, sales biliares, fosfolípidos o un sacárido de alquilo. Ejemplos de ácidos grasos y sales de los mismos incluyen sales de sodio, potasio y lisina de caprilato (C₈), caprato (C₁₀), laurato (C₁₂) y miristato (C₁₄). Los ejemplos de sales biliares incluyen ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido glicocólico, ácido taurocólico, ácido glicoquenodesoxicólico, ácido tauroquenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurodesoxicólico, ácido litedesoxicólico y ácido ursodesoxicólico. Los ejemplos de fosfolípidos incluyen fosfolípidos de cadena sencilla como lisofosfatidilcolina, lisofosfatidilglicerol, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilinositol y lisofosfatidilserina; o fosfolípidos de cadena doble como diacilfosfatidilcolinas, diacilfosfatidilgliceroles, diacilfosfatidiletanolaminas, diacilfosfatidilinositoles y diacilfosfatidilserinas. Los ejemplos de alquil sacáridos incluyen alquil glucósidos o alquil maltósidos, como decil glucósido y dodecil maltósido.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos de administración por vía oral de las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Sin pretender estar limitados a ninguna teoría o mecanismo de acción en particular, se cree que la administración oral de las moléculas de fusión da como resultado la absorción de la molécula de fusión a través de las células epiteliales polarizadas de la mucosa digestiva, por ejemplo, la mucosa intestinal, seguido de la escisión de la molécula de fusión y la liberación de la carga biológicamente activa en el lado basolateral de la membrana de mucosa. Por tanto, cuando la carga biológicamente activa ejerce una actividad biológica en el hígado como, por ejemplo, actividades mediadas por la unión de IL-10 a su receptor cognato, se cree que la carga biológicamente activa ejerce un efecto en exceso de lo que se esperaría en base a las concentraciones en plasma observadas en el sujeto, es decir, la administración oral de la molécula de fusión puede administrarse a un concentración eficaz más alta de la carga biológicamente activa administrada al hígado del sujeto que la que se observa en el plasma del sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a métodos de administración por vía oral de las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Tales métodos pueden incluir, pero no se limitan a, pasos de administración por vía oral de las composiciones por parte del paciente o un proveedor de atención médica. Tales pasos de administración pueden incluir la administración en intervalos como una o dos veces al día dependiendo de la molécula de fusión, enfermedad o afección del paciente o paciente individual. Tales métodos también incluyen la administración de varias dosificaciones de la molécula de fusión individual. Por ejemplo, la dosificación inicial de una composición farmacéutica puede estar en un nivel más alto para inducir un efecto deseado, como la reducción de los niveles de glucosa en sangre. Las dosificaciones posteriores pueden entonces disminuirse una vez que se logre el efecto deseado. Estos cambios o modificaciones en los protocolos de administración pueden realizarse por el médico tratante o el trabajador de atención médica.

Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. El régimen de dosificación lo determinará el médico tratante y los factores clínicos. Como es bien conocido en la técnica médica, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se administrará, el sexo, la hora y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administran concurrentemente. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación dada se determinará fácilmente mediante experimentación de rutina y está dentro de las capacidades y el juicio del practicante clínico o médico ordinario. El experto en la técnica sabe que la cantidad eficaz de una composición farmacéutica administrada a un individuo dependerá, entre otras cosas, de la naturaleza de la carga biológicamente activa. La duración del tratamiento necesario para observar los cambios y el intervalo después del tratamiento para que se produzcan las respuestas varían dependiendo del efecto deseado. Las cantidades particulares pueden determinarse mediante pruebas convencionales que son bien conocidas por el experto en la técnica.

La cantidad de carga biológicamente activa es una cantidad eficaz para lograr el propósito del agente activo particular. La cantidad en la composición es típicamente una cantidad farmacológica, biológica, terapéutica o químicamente eficaz. Sin embargo, la cantidad puede ser menor que una cantidad farmacológica, biológica, terapéutica o químicamente eficaz cuando la composición se usa en una forma de unidad de dosificación como una cápsula, un comprimido o un líquido, porque la forma de unidad de dosificación puede contener una multiplicidad de composiciones de vehículo/agente biológico o químicamente activo o puede contener una cantidad dividida farmacológica, biológica, terapéutica o químicamente eficaz. Las cantidades efectivas totales pueden administrarse luego en unidades acumulativas que contienen, en total, cantidades farmacológica, biológica, terapéutica o químicamente activas de carga biológicamente activa.

En varias realizaciones, una cantidad de molécula de fusión administrada al sujeto es como máximo 0,001 pg, como máximo 1 pg, como máximo 2 pg, como máximo 3 pg, como máximo 4 pg, como máximo 5 pg, como máximo 10 pg, como máximo como máximo 50 pg, como máximo 100 pg, como máximo 1 µg, como máximo 2 µg,

como máximo 3 µg, como máximo 4 µg, como máximo 5 µg, como máximo 10 µg, como máximo 50 µg, como máximo 100 µg, como máximo como máximo 1 mg, como máximo 2 mg, como máximo 3 mg, como máximo 4 mg, como máximo 5 mg, como máximo 10 mg, como máximo 50 mg, como máximo 100 mg o como máximo 1g.

5 En varias realizaciones, una cantidad de molécula de fusión administrada al sujeto es de por lo menos 0,001 pg, por lo menos 1 pg, por lo menos 2 pg, por lo menos 3 pg, por lo menos 4 pg, por lo menos 5 pg, por lo menos 10 pg, por lo menos por lo menos 50 pg, por lo menos 100 pg, por lo menos 1 µg, por lo menos 2 µg, por lo menos 3 µg, por lo menos 4 µg, por lo menos 5 µg, por lo menos 10 µg, por lo menos 50 µg, por lo menos 100 µg, por lo menos por lo menos 1 mg, por lo menos 2 mg, por lo menos 3 mg, por lo menos 4 mg, por lo menos 5 mg, por lo menos 10 mg, por lo menos 50 mg, por lo menos 100 mg o por lo menos 1 g.

10 En varias realizaciones, una cantidad de molécula de fusión administrada al sujeto es de 0,001 µg y aproximadamente 1 g, de 1 µg a 10 pg, de 50 µg a 100 pg, de 1 µg a 5 µg, de 10 µg a 20 µg, de 10 µg a 500 mg, de 10 µg a 100 mg, de 10 µg a 1000 µg, de 10 µg a 250 µg, de 10 µg a 100 µg, de 10 µg a 50 µg, de 1 mg a 5 mg, o de 10 mg a 100 mg.

15 El volumen de una composición que comprende la molécula de fusión que se administra dependerá generalmente de la concentración de la molécula de fusión y la formulación de la composición. En varias realizaciones, una dosis unitaria de la composición de la molécula de fusión es de 0,001 µl a 1 ml, de 1 µl a 100 µl, de 50 µl a 500 µl, de 0,01 ml a 1 ml, de 1 ml a 100 ml, de 0,05 ml a 1 ml. Por ejemplo, la dosis unitaria de la composición de la molécula de fusión puede ser de aproximadamente 0,5 ml.

20 En algunas realizaciones, una dosis unitaria de la composición de la molécula de fusión es como máximo aproximadamente 0,001 µl, como máximo 1 µl, como máximo 10 µl, como máximo 50 µl, como máximo 200 µl, como máximo 0,01 ml, como máximo 0,05 ml, como máximo como máximo 0,1 ml, como máximo 0,2 ml, como máximo 0,5 ml o como máximo 1 ml.

25 En algunas, una dosis unitaria de la composición de la molécula de fusión es de por lo menos 0,001 µl, por lo menos 1 µl, por lo menos 10 µl, por lo menos 50 µl, por lo menos 200 µl, por lo menos 0,01 ml, por lo menos 0,05 ml, por lo menos 0,1 ml, por lo menos 0,2 ml, por lo menos 0,5 ml o por lo menos 1 ml.

30 Las composiciones de moléculas de fusión pueden prepararse en formas de dosificación que contienen entre 1 y 50 dosis (por ejemplo, de 0,5 ml a 25 ml), más habitualmente entre 1 y 10 dosis (por ejemplo, de 0,5 ml a 5 ml).

35 Las composiciones de moléculas de fusión de la divulgación pueden administrarse en una dosis o en múltiples dosis. Una dosis puede ir seguida de una o más dosis espaciadas de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 horas, de aproximadamente 6 a aproximadamente 12 horas, de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 3 días, de aproximadamente 1 día a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, de aproximadamente 2 semanas a aproximadamente 1 mes, de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 semanas, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 meses, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 meses.

40 En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de fusión pueden, aunque no necesariamente, administrarse diariamente, en una cantidad eficaz para mejorar un síntoma. Generalmente, la dosificación diaria total puede administrarse en una cantidad de por lo menos aproximadamente 0,001 pg, por lo menos aproximadamente 0,1 mg, por lo menos aproximadamente 1 mg, por lo menos aproximadamente 10 mg, por lo menos aproximadamente 50 mg, por lo menos aproximadamente 100 mg, por lo menos aproximadamente 150 mg, por lo menos aproximadamente 200 mg, por lo menos aproximadamente 250 mg, por lo menos aproximadamente 300 mg, por lo menos aproximadamente 350 mg, por lo menos aproximadamente 400 mg, por lo menos aproximadamente 450 mg, por lo menos aproximadamente 500 mg al día, o por lo menos aproximadamente 1000 mg al día. Por ejemplo, la dosificación puede formularse para administración oral en cápsulas o comprimidos, como 4 cápsulas o comprimidos, cada uno de los cuales contiene 50 mg de molécula de fusión. Las cápsulas o comprimidos para administración oral pueden contener convenientemente hasta una dosis oral diaria completa, por ejemplo 200 mg o más al día.

45 En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de fusión pueden, aunque no necesariamente, administrarse diariamente, en una cantidad eficaz para mejorar un síntoma. Generalmente, la dosificación diaria total puede administrarse en una cantidad de como máximo 50 mg al día, como máximo 100 mg al día, como máximo 150 mg al día, como máximo 200 mg al día, como máximo 250 mg al día, como máximo 300 mg al día, como máximo 350 mg al día, como máximo 400 mg al día, como máximo 450 mg al día, como máximo 500 mg al día o como máximo 1000 mg al día.

60 Como se usa en la presente, se pretende que los términos "coadministración", "coadministrado" y "en combinación con", en referencia a las moléculas de fusión de la divulgación y uno o más de otros agentes

65

terapéuticos, que signifiquen y se refieren a e incluyen lo siguiente: la administración simultánea de dicha combinación de moléculas de fusión de la divulgación y agentes terapéuticos a un paciente con necesidad de tratamiento, cuando tales componentes se formulan juntos en una única forma de dosificación que libera dichos componentes sustancialmente al mismo tiempo para dicho paciente; administración sustancialmente simultánea de tal combinación de moléculas de fusión de la divulgación y agentes terapéuticos a un paciente con necesidad de tratamiento, cuando tales componentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que son tomadas sustancialmente al mismo tiempo por dicho paciente, después de lo cual dichos componentes se liberan sustancialmente al mismo tiempo a dicho paciente; administración secuencial de tal combinación de moléculas de fusión de la divulgación y agentes terapéuticos a un paciente con necesidad de tratamiento, cuando tales componentes se formulan separados entre sí en formas de dosificación separadas que son tomadas en momentos consecutivos por dicho paciente con un intervalo de tiempo significativo entre cada administración, tras lo cual dichos componentes se liberan en momentos sustancialmente diferentes a dicho paciente; y administración secuencial de tal combinación de moléculas de fusión de la divulgación y agentes terapéuticos a un paciente con necesidad de tratamiento, cuando tales componentes se formulan juntos en una forma de dosificación individual que libera dichos componentes de manera controlada tras lo cual se liberan de manera concurrente, consecutiva y/o superpuesta en momentos iguales y/o diferentes a dicho paciente, donde cada parte puede administrarse por cualquiera de la misma vía o una diferente.

En varias realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de fusión pueden coadministrarse con un segundo componente, en donde el segundo componente es una hormona, toxina o agente bioactivo que es capaz de unirse al receptor de GM-1 (monosialotetrahexosilgangliósido) (Hakomori, *Advances in Exp. Medicine and Biology*, 174:333-339, 1984). En varias realizaciones, el segundo componente es el virus SV40, el virus del poliovirus o una toxina como la toxina del cólera o la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* (PE).

Como se usa en la presente, los términos "toxina del cólera" o "CT" se refieren al agente de virulencia epónimo de la bacteria *Vibrio cholerae*, que puede provocar diarrea acuosa masiva aguda y potencialmente mortal. CT es un complejo proteico compuesto por una sola subunidad A organizada con un pentámero de subunidades B que se une a las estructuras de gangliósidos G_{M1} de la superficie celular en la superficie apical de los epitelios. La CT es secretada por *V. cholera* después de la transferencia horizontal de genes con cepas virulentas de *V. cholerae* que llevan una variante de bacteriófago lisogénico llamado CTXf o CTX ϕ . Sin embargo, los recientes brotes de cólera han sugerido que las cepas de algunos serogrupos (no O1, no O139) no expresan CT sino que usan otros factores de virulencia. Los análisis detallados de datos ambientales y clínicos no O1, no O139 sugirieron la presencia de una nueva exotoxina secretada putativa con cierta similitud con la PE. La secuencia de CT es conocida y se ha descrito (Mekalanos J.J. et al *Nature* 306, página 551 (1983)).

Como se usa en la presente, los términos "exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*", "exotoxina A de *Pseudomonas*" o "PE" se refieren a una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas. La secuencia de 613 residuos de PE es bien conocida en la técnica y se expone, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.602.095. El dominio I (aminoácidos 1-252) media la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación en el citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media la ribosilación de ADP del factor de elongación 2. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) permanece indefinida, aunque se sabe que una gran parte de él, los aminoácidos 365-380, pueden eliminarse sin pérdida de citotoxicidad. Ver Siegall et al., *J Biol Chem*, 264:14256-61 (1989).

En la técnica se conocen ciertos fragmentos citotóxicos de PE y a menudo se hace referencia al peso molecular del fragmento, que designa para el experto en la técnica la composición particular del fragmento de PE. Por ejemplo, PE40 fue uno de los primeros fragmentos que se estudió y usó como la porción tóxica de las inmunotoxinas. El término designa una forma truncada de PE en cuyo dominio Ia, el dominio responsable de la unión no específica. Ver, por ejemplo, Pai et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 88:3358-3362 (1991); y Kondo et al., *J. Biol. Chem.*, 263:9470-9475 (1988). Sin embargo, la eliminación de la unión no específica también puede lograrse mediante la mutación de ciertos residuos del dominio Ia. La Patente de Estados Unidos N° 5.512.658, por ejemplo, divulga una PE mutada en la que está presente el dominio Ia pero en la que los residuos básicos del dominio Ia en las posiciones 57, 246, 247 y 249 se reemplazan con residuos ácidos (ácido glutámico o "E") muestra citotoxicidad no específica altamente disminuida. A esta forma mutante de PE se hace referencia a veces como "PE4E".

En varias realizaciones, la terapia de combinación comprende administrar la composición de la molécula de fusión aislada y la composición del segundo agente simultáneamente, ya sea en la misma composición farmacéutica o en composiciones farmacéuticas separadas. En varias realizaciones, la composición de la molécula de fusión aislada y la composición del segundo agente se administran secuencialmente, es decir, la composición de la molécula de fusión aislada se administra antes o después de la administración de la segunda composición del agente.

En varias realizaciones, las administraciones de la composición de la molécula de fusión aislada y la composición del segundo agente son concurrentes, es decir, el período de administración de la composición de la

molécula de fusión aislada y la composición del segundo agente se superponen entre sí.

En varias realizaciones, las administraciones de la composición de la molécula de fusión aislada y la composición del segundo agente no son simultáneas. Por ejemplo, en varias realizaciones, se termina la administración de la composición de la molécula de fusión aislada antes de que se administre la composición del segundo agente. En varias realizaciones, se termina la administración de la composición del segundo agente antes de que se administre la composición de la molécula de fusión aislada. En varias realizaciones, las administraciones de la molécula de fusión de la divulgación, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, pueden lograrse con una comida, por ejemplo, antes de la comida, durante la comida o después de la comida.

En algunas realizaciones, la administración de la molécula de fusión de la divulgación, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede lograrse antes de una comida. En varias realizaciones, la molécula de fusión de la invención, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede administrarse más de 12 horas, más de 11 horas, más de 10 horas, más de 9 horas, más de 8 horas, más de 7 horas, más de 6 horas, más de 5 horas, más de 4 horas, más de 3 horas, más de 2 horas, más de 1 hora, más de 50 minutos, más de 40 minutos, más de 30 minutos, más de 20 minutos, más de 10 minutos, más de 5 minutos o más de 1 minuto antes de la comida. En varias realizaciones, la molécula de fusión de la invención, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede administrarse menos de 12 horas, menos de 11 horas, menos de 10 horas, menos de 9 horas, menos de 8 horas, menos de 7 horas, menos de 6 horas, menos de 5 horas, menos de 4 horas, menos de 3 horas, menos de 2 horas, menos de 1 hora, menos de 50 minutos, menos de 40 minutos, menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos o menos de 1 minuto antes de la comida. En varias realizaciones, la molécula de fusión de la invención, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede administrarse entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 10 minutos, entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 60 minutos, entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 10 horas, o entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 12 horas antes de la comida.

En algunas realizaciones, la administración de la molécula de fusión de la invención, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede lograrse después de una comida. En varias realizaciones, la molécula de fusión de la invención, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede administrarse más de 12 horas, más de 11 horas, más de 10 horas, más de 9 horas, más de 8 horas, más de 7 horas, más de 6 horas, más de 5 horas, más de 4 horas, más de 3 horas, más de 2 horas, más de 1 hora, más de 50 minutos, más de 40 minutos, más de 30 minutos, más de 20 minutos, más de 10 minutos, más de 5 minutos o más de 1 minuto después de la comida. En algunas realizaciones, la molécula de fusión de la invención, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede administrarse menos de 12 horas, menos de 11 horas, menos de 10 horas, menos de 9 horas, menos de 8 horas, menos de 7 horas, menos de 6 horas, menos de 5 horas, menos de 4 horas, menos de 3 horas, menos de 2 horas, menos de 1 hora, menos de 50 minutos, menos de 40 minutos, menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos o menos de 1 minuto después de la comida. En varias realizaciones, la molécula de fusión de la invención, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede administrarse menos de 12 horas, menos de 11 horas, menos de 10 horas, menos de 9 horas, menos de 8 horas, menos de 7 horas, menos de 6 horas, menos de 5 horas, menos de 4 horas, menos de 3 horas, menos de 2 horas, menos de 1 hora, menos de 50 minutos, menos de 40 minutos, menos de 30 minutos, menos de 20 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos o menos de 1 minuto antes de la comida. En varias realizaciones, la molécula de fusión de la divulgación, ya sea sola o en combinación con un agente terapéutico, puede administrarse entre aproximadamente 1 minuto y aproximadamente 10 minutos, entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 30 minutos, entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 60 minutos, entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 3 horas, entre aproximadamente 2 horas y aproximadamente 10 horas, o entre aproximadamente 5 horas y aproximadamente 12 horas después de la comida.

Métodos de uso

En otro aspecto, las composiciones farmacéuticas formuladas para administración oral se usan para tratar ciertas clases de enfermedades o afecciones médicas que son particularmente adecuadas para la formulación y administración oral. Tales clases de enfermedades o afecciones incluyen, por ejemplo, enfermedades o infecciones virales, cáncer, enfermedades metabólicas, obesidad, enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias, alergia, enfermedad de injerto contra huésped, infección microbiana sistémica, anemia, enfermedad cardiovascular, psicosis, enfermedades genéticas, enfermedades neurodegenerativas, trastornos de las células hematopoyéticas, enfermedades del sistema endocrino o reproductor, enfermedades gastrointestinales. En muchas enfermedades crónicas, las formulaciones orales de las moléculas de fusión de la divulgación son particularmente útiles ya que permiten el cuidado del paciente a largo plazo y la terapia a través de la administración oral en casa sin dependencia de protocolos de tratamiento o fármacos inyectables.

En varias realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de fusión de la divulgación para su uso en el tratamiento y/o prevención de

enfermedades inflamatorias. Las "enfermedades inflamatorias" incluyen todas las enfermedades asociadas con la inflamación aguda o crónica. La inflamación aguda es la respuesta inicial del cuerpo a estímulos dañinos y es el resultado de un aumento del movimiento de plasma y leucocitos (como, por ejemplo, granulocitos) desde la sangre hacia los tejidos lesionados. Varios eventos bioquímicos propagan y maduran la respuesta inflamatoria, implicando al sistema vascular local, el sistema inmunitario y varias células dentro del tejido lesionado. A la inflamación prolongada se hace referencia como inflamación crónica, 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 estar provocadas por, por ejemplo, quemaduras, irritantes químicos, congelación, toxinas, infección por patógenos, lesiones físicas, reacciones inmunes debidas a hipersensibilidad, radiación ionizante o cuerpos extraños como, por ejemplo, astillas, suciedad y desechos. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias son bien conocidos en la técnica.

En varias realizaciones, la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste de enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis y sepsis bacteriana. El término "enfermedad inflamatoria intestinal", como se usa en la presente, se refiere a un grupo de afecciones inflamatorias del colon y del intestino delgado que incluyen, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de derivación, síndrome de Behcet y colitis indeterminada.

La "enfermedad de Crohn", de acuerdo con la presente divulgación, es una enfermedad inflamatoria intestinal de tipo 1 (Th 1) T-adyuvante, que tiene un patrón de respuesta inmune que incluye una producción incrementada de interleucina-12, factor de necrosis tumoral (TNF), e interferón- γ (Romagnani. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5:285-94), y que puede tener un impacto devastador sobre el estilo de vida de un paciente que lo padece. Los síntomas comunes de la enfermedad de Crohn incluyen diarrea, calambres, dolor abdominal, fiebre e incluso sangrado rectal. La enfermedad de Crohn y las complicaciones asociadas con ella a menudo hacen que el paciente requiera cirugía, a menudo más de una vez. No hay una cura conocida para la enfermedad de Crohn y las opciones de tratamiento eficaces a largo plazo son limitadas. Los objetivos del tratamiento son controlar la inflamación, corregir las deficiencias nutricionales y aliviar síntomas como el dolor abdominal, la diarrea y el sangrado rectal. Aunque el tratamiento puede ayudar a controlar la enfermedad disminuyendo la cantidad de veces que una persona experimenta una recurrencia, no hay una cura. El tratamiento puede incluir fármacos, suplementos nutricionales, cirugía o una combinación de estas opciones. Los tratamientos comunes que pueden administrarse para el tratamiento incluyen fármacos antiinflamación incluyendo sulfasalazina, cortisona o esteroides, incluyendo prednisona, supresores del sistema inmune, como 6-mercaptopurina o azatioprina, y antibióticos.

La "psoriasis", de acuerdo con la presente divulgación, es una enfermedad que afecta a la piel y las articulaciones. Por lo general, hace que aparezcan manchas rojas escamosas en la piel. Las manchas escamosas provocadas por la psoriasis, llamadas placas psoriásicas, son áreas de inflamación y producción excesiva de piel. La piel se acumula rápidamente en estos sitios y adquiere un aspecto de color blanco plateado. Las placas se producen con frecuencia en la piel de los codos y las rodillas, pero pueden afectar a cualquier área, incluyendo el cuero cabelludo y los genitales. Se hace la hipótesis de que la psoriasis es inmunomediada y no es contagiosa. El trastorno es una afección crónica recurrente que varía en gravedad desde parches localizados menores hasta una cobertura corporal completa. Las uñas de las manos y de los pies se ven afectadas con frecuencia (distrofia ungueal psoriásica) y puede considerarse un descubrimiento aislado. La psoriasis también puede provocar inflamación de las articulaciones, lo que se conoce como artritis psoriásica. Entre el diez y el quince por ciento de las personas con psoriasis tienen artritis psoriásica.

El término "sepsis bacteriana", como se usa en la presente, se refiere a afecciones potencialmente mortales que resultan de la circulación de bacterias en el torrente sanguíneo. La sepsis da como resultado la producción sistémica generalizada de citoquinas proinflamatorias que da como resultado daño tisular y, en última instancia, shock séptico debido al fallo de la microcirculación.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a métodos para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de una enfermedad autoinmune, que comprenden administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en un régimen de terapia de combinación) de una molécula de fusión descrita en la presente, en un portador farmacéuticamente aceptable.

Una enfermedad autoinmune, en lo que respecta a la presente divulgación, es una enfermedad o trastorno que surge de y está dirigido contra los propios tejidos de un individuo o un co-segregado o manifestación de los mismos o condición resultante de los mismos. En varias realizaciones, la enfermedad autoinmune se selecciona del grupo que consiste de lupus eritematoso sistémico (SLE), pénfigo vulgar, miastenia grave, anemia hemolítica, púrpura trombocitopénica, enfermedad de Grave, enfermedad de Sjogren, dermatomiositis, enfermedad de Hashimoto, polimiositis, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple (MS), diabetes mellitus, artritis reumatoide y esclerodermia.

La "artritis reumatoide", de acuerdo con la presente divulgación, es un trastorno autoinmune que hace que el sistema inmune del cuerpo ataque a las articulaciones óseas (Muller B et al., *Springer Semin Immunopathol.*,

20:181-96, 1998). La artritis reumatoide es un trastorno inflamatorio sistémico crónico que puede afectar a muchos tejidos y órganos, pero que ataca principalmente a las articulaciones sinoviales. El proceso produce una respuesta inflamatoria de la sinovial (sinovitis) secundaria a hiperplasia de las células sinoviales, exceso de líquido sinovial y desarrollo de pannus en la sinovial. La patología del proceso de la enfermedad a menudo lleva a la destrucción del cartílago articular y la anquilosis de las articulaciones. La artritis reumatoide también puede producir inflamación difusa en los pulmones, pericardio, pleura y esclerótica, y también lesiones nodulares, más comunes en el tejido subcutáneo debajo de la piel.

En varias realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de fusión de la divulgación para su uso en el tratamiento, profilaxis y/o prevención de un cáncer, que comprenden administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz (ya sea como monoterapia o en régimen de terapia de combinación) de una molécula de fusión descrita en la presente, en un portador farmacéuticamente aceptable. Los cánceres a tratar incluyen, pero no se limitan a, linfomas no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiple, carcinomas de páncreas, colon, intestino gástrico, próstata, vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, nasofaringe, melanoma maligno y NHL y leucemia resistentes a rituximab.

En varias realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula de fusión descrita en la presente se administrará en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Tales agentes terapéuticos pueden aceptarse en la técnica como un tratamiento estándar para un estado de enfermedad particular como se describe en la presente, tal como enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune o cáncer. Los agentes terapéuticos adicionales contemplados incluyen, pero no se limitan a, citoquinas, factores de crecimiento, esteroides, NSAID, DMARD, antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos u otros agentes activos y auxiliares.

En varias realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno metabólico, dicho método comprendiendo administrar por vía oral una molécula de fusión de la presente divulgación en una cantidad suficiente para tratar dicho trastorno, en donde dicho trastorno metabólico es diabetes, obesidad, diabetes como consecuencia de obesidad, hiperglucemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, síndrome X, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa alterada (IGT), dislipidemia diabética o hiperlipidemia.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad del hígado graso (por ejemplo, enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); esteatohepatitis no alcohólica (NASH)), una enfermedad gastrointestinal o una enfermedad neurodegenerativa, dicho método comprendiendo administrar por vía oral una molécula de fusión de la presente divulgación en una cantidad suficiente para tratar dicha enfermedad.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de una molécula de fusión de origen no natural de la presente divulgación para la preparación de un medicamento para el tratamiento, profilaxis y/o prevención de trastornos del crecimiento por deficiencia de GH en un sujeto con necesidad de ello.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene un trastorno del crecimiento por deficiencia de GH, dicho método comprendiendo administrar por vía oral una molécula de fusión de la presente divulgación en una cantidad suficiente para tratar dicho trastorno, en donde dicho trastorno es una deficiencia de la hormona del crecimiento (GHD), síndrome de Turner (TS), síndrome de Noonan, síndrome de Prader-Willi, deficiencia del gen que contiene homeobox de estatura baja (SHOX), insuficiencia renal crónica y síndrome de intestino corto idiopático de baja estatura, deficiencia de GH debida a tumores pituitarios raros o su tratamiento y enfermedad de desgaste muscular asociada con el VIH/SIDA.

Polinucleótidos que codifican moléculas de fusión

En otro aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica las moléculas de fusión de origen no natural. Estos polinucleótidos son útiles, por ejemplo, para elaborar moléculas de fusión. En otro aspecto más, la divulgación proporciona un sistema de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos recombinante que codifica una toxina de Cholix modificada y un sitio de inserción de policonector para una secuencia de polinucleótidos que codifica una carga biológicamente activa. El sitio de inserción del policonector puede estar en cualquier lugar de la secuencia de polinucleótidos siempre que la inserción del policonector no altere el dominio de unión al receptor o el dominio de transcritosis de la toxina de Cholix modificada. En varias realizaciones, el sistema de expresión puede comprender una secuencia de polinucleótidos que codifica un conector escindible de tal manera que la escisión en el conector escindible separa una carga biológicamente activa codificada por un ácido nucleico insertado en el sitio de inserción del policonector del resto de la molécula de fusión codificada. Por tanto, en realizaciones en las que el sitio de inserción del policonector está en un extremo del constructo codificado, el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un conector escindible entre el sitio de inserción del policonector y el resto del polinucleótido. En realizaciones en las que el sitio de inserción del policonector no está al final del constructo codificado, el sitio de inserción del

policonector puede estar flanqueado por secuencias de nucleótidos que codifican cada una de ellas un conector escindible.

5 Varios métodos *in vitro* que pueden usarse para preparar un polinucleótido que codifica una toxina de Cholix modificada útil en las moléculas de fusión de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, la transcripción inversa, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencia autosostenida (3SR) y el sistema de amplificación de replicasa QP (QB). Puede usarse cualquier técnica de este tipo conocida por un experto en la técnica como útil en la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. Por ejemplo, un polinucleótido que
10 codifica la proteína o una porción de la misma puede aislarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa del ADNc usando cebadores basados en la secuencia de ADN de una toxina de Cholix modificada o un nucleótido que codifica, por ejemplo, un dominio de unión a receptor.

15 La guía para el uso de estas metodologías de clonación y amplificación *in vitro* se describe en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.683.195; Mullis et al., 1987, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; y Erlich, ed., 1989, PCR Technology, Stockton Press, NY. Los polinucleótidos que codifican una molécula de fusión o una porción de la misma también pueden aislarse mediante la selección de bibliotecas genómicas o de ADNc con sondas seleccionadas de las secuencias del polinucleótido deseado en condiciones de hibridación rigurosas, moderadamente rigurosas o muy rigurosas.
20

La construcción de ácidos nucleicos que codifican las moléculas de fusión de la divulgación puede facilitarse introduciendo un sitio de inserción para un ácido nucleico que codifica la carga biológicamente activa en el constructo. En varias realizaciones, puede introducirse un sitio de inserción para la carga biológicamente activa entre los nucleótidos que codifican los residuos de cisteína del dominio Ib de la toxina de Cholix modificada. En otras
25 realizaciones, el sitio de inserción puede introducirse en cualquier parte del ácido nucleico que codifica el constructo siempre que la inserción no altere los dominios funcionales codificados por el mismo. En varias realizaciones, el sitio de inserción puede estar en el dominio de retención de ER.

Además, los polinucleótidos también pueden codificar una secuencia secretora en el extremo terminal amino de la molécula de fusión codificada. Tales constructos son útiles para producir las moléculas de fusión en células de mamíferos ya que simplifican el aislamiento del inmunógeno.
30

Además, los polinucleótidos de la divulgación también abarcan versiones derivadas de polinucleótidos que codifican una molécula de fusión. Tales derivados pueden elaborarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica sin limitación. Por ejemplo, pueden elaborarse derivados mediante mutagénesis específica de sitio, incluyendo la sustitución, inserción o delección de uno, dos, tres, cinco, diez o más nucleótidos de polinucleótidos que codifican la molécula de fusión. Alternativamente, los derivados pueden elaborarse mediante mutagénesis aleatoria. Un método para mutagenizar aleatoriamente un ácido nucleico comprende amplificar el ácido nucleico en una reacción de PCR en presencia de MnCl₂ 0,1 mM y concentraciones de nucleótidos desequilibradas.
35 Estas condiciones aumentan la tasa de incorporación de inexactitud de la polimerasa usada en la reacción de PCR y dan como resultado una mutagénesis aleatoria del ácido nucleico amplificado.
40

Por consiguiente, en varias realizaciones, la divulgación proporciona un polinucleótido que codifica una molécula de fusión. La molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada y una carga biológicamente activa para ser administrada a un sujeto; y, opcionalmente, un conector no escindible o escindible. La escisión en el conector escindible puede separar la carga biológicamente activa del resto de la molécula de fusión. El conector escindible puede escindirse mediante una enzima que está presente en una membrana basolateral de una célula epitelial polarizada del sujeto o en el plasma del sujeto.
45

En varias realizaciones, el polinucleótido hibrida en condiciones de hibridación rigurosas con cualquier polinucleótido de esta divulgación. En realizaciones adicionales, el polinucleótido hibrida en condiciones rigurosas con un ácido nucleico que codifica cualquier molécula de fusión de la divulgación.
50

En otro aspecto más, la divulgación proporciona vectores de expresión para expresar las moléculas de fusión. Generalmente, los vectores de expresión son moléculas de polinucleótidos recombinantes que comprenden secuencias de control de la expresión enlazadas operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido. Los vectores de expresión pueden adaptarse fácilmente para funcionar en procariontes o eucariotas mediante la inclusión de promotores apropiados, secuencias de replicación, marcadores seleccionables, etc. para dar como resultado una transcripción y traducción o ARNm estables. Las técnicas para la construcción de vectores de expresión y la expresión de genes en células que comprenden los vectores de expresión son bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., YAsubel et al., Eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.
55

Los promotores útiles para su uso en vectores de expresión incluyen, pero no se limitan a, un promotor de
65

metalotioneína, un promotor tardío principal de adenovirus constitutivo, un promotor de MMTV inducible por dexametasona, un promotor de SV40, un promotor de MRP pol III, un promotor de MPSV constitutivo, un promotor de CMV inducible por tetraciclina (como el promotor de CMV temprano inmediato humano) y un promotor de CMV constitutivo.

5 Los vectores de expresión deben contener señales de expresión y replicación compatibles con la célula en la que se expresan las moléculas de fusión. Los vectores de expresión útiles para expresar moléculas de fusión incluyen vectores virales como retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados, vectores plasmídicos, cósmidos y similares. Se prefieren los vectores virales y plasmídicos para transfectar los vectores de expresión en células de mamífero. Por ejemplo, el vector de expresión pcDNA1 (Invitrogen, San Diego, CA), en el que la secuencia de control de la expresión comprende el promotor de CMV, proporciona buenas tasas de transfección y expresión en tales células.

15 Los vectores de expresión pueden introducirse en la célula para la expresión de las moléculas de fusión mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica sin limitación. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, la absorción directa de la molécula por una célula de la solución; captación facilitada mediante lipofección usando, por ejemplo, liposomas o inmunoliposomas; transfección mediada por partículas; etc. Ver, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.272.065; Goeddel et al., Eds, 1990, *Methods in Enzymology*, vol. 185, Academic Press, Inc., CA; Krieger, 1990, *Gene Transfer and Expression--A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; y Ausubel et al., eds., Current Edition, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.

25 Los vectores de expresión también pueden contener una fracción de purificación que simplifica el aislamiento de la molécula de fusión. Por ejemplo, puede incorporarse una fracción de polihistidina de, por ejemplo, seis residuos de histidina, en el extremo amino terminal de la proteína. La fracción de polihistidina permite el aislamiento conveniente de la proteína en un solo paso mediante cromatografía de quelato de níquel. En varias realizaciones, la fracción de purificación puede escindirse del resto de la molécula de fusión después de la purificación. En otras realizaciones, la fracción no interfiere con la función de los dominios funcionales de la molécula de fusión y, por tanto, no es necesario escindir.

35 En otro aspecto más, la divulgación proporciona una célula que comprende un vector de expresión para la expresión de las moléculas de fusión, o porciones de las mismas. La célula se selecciona por su capacidad para expresar altas concentraciones de la molécula de fusión para facilitar la purificación de la proteína. En varias realizaciones, la célula es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. Como se describe en los ejemplos, las moléculas de fusión se pliegan apropiadamente y comprenden los enlaces disulfuro apropiados cuando se expresan en *E. coli*.

40 En otras realizaciones, la célula es una célula eucariota. Las células eucariotas útiles incluyen células de levadura y de mamífero. Puede usarse cualquier célula de mamífero conocida por un experto en la técnica como útil para expresar un polipéptido recombinante, sin limitación, para expresar las moléculas de fusión. Por ejemplo, pueden usarse células de ovario de hámster chino (CHO) para expresar las moléculas de fusión.

45 Las moléculas de fusión de la divulgación pueden producirse mediante recombinación, como se describe a continuación. Sin embargo, las moléculas de fusión también pueden producirse mediante síntesis química usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

50 Los métodos para expresar y purificar las moléculas de fusión de la divulgación se describen ampliamente en los ejemplos siguientes. Generalmente, los métodos se basan en la introducción de un vector de expresión que codifica la molécula de fusión en una célula que puede expresar la molécula de fusión del vector. Luego, la molécula de fusión puede purificarse para su administración a un sujeto.

Prueba de transcitosis

55 La función del dominio de transcitosis puede probarse en función de la capacidad de la molécula de fusión para atravesar una membrana epitelial. Como la transcitosis requiere primero la unión a la célula, estos ensayos también pueden usarse para evaluar la función del dominio de reconocimiento celular.

60 La actividad de transcitosis de la molécula de fusión puede probarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, sin limitación. En varias realizaciones, la actividad de transcitosis puede probarse evaluando la capacidad de una molécula de fusión para introducirse en una célula no polarizada a la que se une. Sin pretender estar limitado por ninguna teoría o mecanismo de acción particular, se cree que la misma propiedad que permite que un dominio de transcitosis pase a través de una célula epitelial polarizada también permite que las moléculas que llevan el dominio de transcitosis se introduzcan en células no polarizadas. Por tanto, la capacidad de la molécula de fusión para introducirse en la célula puede evaluarse, por ejemplo, detectando la presencia física del

5 constructo en el interior de la célula. Por ejemplo, la molécula de fusión puede marcarse con, por ejemplo, un marcador fluorescente, y la molécula de fusión exponerse a la célula. Luego, pueden lavarse las células, eliminar cualquier molécula de fusión que no haya entrado en la célula y determinar la cantidad de marcador restante. La detección del marcador en esta tracción indica que la molécula de fusión se ha introducido en la célula.

10 En otras realizaciones, la capacidad de transcitosis de la molécula de fusión puede probarse evaluando la capacidad de la molécula de fusión para pasar a través de una célula epitelial polarizada. Por ejemplo, la molécula de fusión puede marcarse con, por ejemplo, un marcador fluorescente y ponerse en contacto con las membranas apicales de una capa de células epiteliales. La fluorescencia detectada en el lado basolateral de la membrana formada por las células epiteliales indica que el dominio de transcitosis está funcionando correctamente.

Prueba de escisión del conector escindible

15 La función del conector escindible puede probarse generalmente en un ensayo de escisión. Puede usarse cualquier ensayo de escisión adecuado conocido por un experto en la técnica, sin limitación, para probar los conectores escindibles. Pueden usarse tanto ensayos basados en células como libres de células para probar la capacidad de una enzima para escindir los conectores escindibles.

20 Un ensayo libre de células ejemplar para probar la escisión de conectores escindibles comprende preparar extractos de células epiteliales polarizadas y exponer una molécula de fusión marcada que lleva un conector escindible a la fracción del extracto que corresponde a enzimas asociadas a la membrana. En tales ensayos, el marcador puede unirse a la carga biológicamente activa que se va a administrar o al resto de la molécula de fusión. Entre estas enzimas se encuentran las enzimas de escisión que se encuentran cerca de la membrana basolateral de una célula epitelial polarizada, como se ha descrito con anterioridad. La escisión puede detectarse, por ejemplo, uniendo la molécula de fusión con, por ejemplo, un anticuerpo y eliminando por lavado las moléculas no unidas. Si el marcador está adherido a la carga biológicamente activa que se va a administrar, entonces debe observarse poco o ningún marcador en la molécula unida a los anticuerpos. Alternativamente, el agente de unión usado en el ensayo puede ser específico para la carga biológicamente activa, y el resto del constructo puede estar marcado. En cualquier caso, puede evaluarse la escisión.

30 La escisión también puede probarse usando ensayos basados en células que prueban la escisión por células epiteliales polarizadas ensambladas en membranas. Por ejemplo, una molécula de fusión marcada, o parte de una molécula de fusión que comprende el conector escindible, puede ponerse en contacto con el lado apical o basolateral de una monocapa de células epiteliales adecuadas, como, por ejemplo, células Coco-2, en condiciones que permiten la escisión del conector. La escisión puede detectarse detectando la presencia o ausencia del marcador usando un reactivo que se une específicamente a la molécula de fusión, o porción de la misma. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo específico para la molécula de fusión para unir una molécula de fusión que comprende un marcador distal al conector escindible con respecto a la porción de la molécula de fusión unida por el anticuerpo. Luego, puede evaluarse la escisión detectando la presencia del marcador en las moléculas unidas al anticuerpo. Si se ha producido una escisión, debe observarse poco o ningún marcador en las moléculas unidas al anticuerpo. Al realizar tales experimentos, pueden identificarse las enzimas que se escinden preferentemente en la membrana basolateral en lugar de en la membrana apical y, además, puede confirmarse la capacidad de tales enzimas para escindir el conector escindible en una molécula de fusión.

45 Además, la escisión también puede probarse usando un ensayo indicador de fluorescencia como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6.759.207. Brevemente, en tales ensayos, el informador de fluorescencia se pone en contacto con el lado basolateral de una monocapa de células epiteliales adecuadas en condiciones que permiten que la enzima de escisión escinda el informador. La escisión del informador cambia la estructura del informador de fluorescencia, cambiándola de una configuración no fluorescente a una configuración fluorescente. La cantidad de fluorescencia observada indica la actividad de la enzima de escisión presente en la membrana basolateral.

55 Además, la escisión también puede probarse usando una sonda molecular inactivada intramolecularmente, como las descritas en Patente de Estados Unidos N° 6.592.847. Tales sondas generalmente comprenden una fracción fluorescente que emite fotones cuando se excita con luz de longitud de onda apropiada y una fracción de inactivación que absorbe tales fotones cuando se encuentran muy cerca de la fracción fluorescente. La escisión de la sonda separa la fracción de inactivación de la fracción fluorescente, de tal manera que puede detectarse la fluorescencia, lo que indica que se ha producido la escisión. Por tanto, tales sondas pueden usarse para identificar y evaluar la escisión por enzimas de escisión particulares poniendo en contacto el lado basolateral de una monocapa de células epiteliales adecuadas con la sonda en condiciones que permitan que la enzima de escisión escinda la sonda. La cantidad de fluorescencia observada indica la actividad de la enzima de escisión que se está probando.

Moléculas ejemplares de fusión de toxina de Cholix y carga biológicamente activa

65 Las realizaciones de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, las moléculas de fusión

ES 2 900 328 T3

descritas en la Tabla 7.

Tabla 7

	Toxina de Cholix modificada (SEQ ID NO)	Conector divisible (SEQ ID NO)	Carga biológicamente activa (SEQ ID NO)
5	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
10	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
15	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
20	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
25	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
30	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
35	SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
40	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
45	SEQ ID NO: 19	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
50	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
55	SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
60	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
65	SEQ ID NO: 27	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95

ES 2 900 328 T3

(continuación)

	Toxina de Cholix modificada (SEQ ID NO)	Conector divisible (SEQ ID NO)	Carga biológicamente activa (SEQ ID NO)
5	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
10	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
15	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 33	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
20	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
25	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 37	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
30	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 39	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
35	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 41	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
40	SEC ID N.º 42	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
45	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
50	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
55	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 49	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
60	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
65	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95

ES 2 900 328 T3

(continuación)

	Toxina de Cholix modificada (SEQ ID NO)	Conector divisible (SEQ ID NO)	Carga biológicamente activa (SEQ ID NO)
5	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
10	SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
15	SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
20	SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
25	SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
30	SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
35	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
40	SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
45	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
50	SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
55	SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
60	SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
65	SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95

(continuación)

Toxina de Cholix modificada (SEQ ID NO)	Conector divisible (SEQ ID NO)	Carga biológicamente activa (SEQ ID NO)
SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95
SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 96-121 Sin conector	SEQ ID NO: 82-95

5

10

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y una carga biológicamente activa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

15

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 70 y una carga biológicamente activa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

20

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 42 y una carga biológicamente activa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.

25

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 114.

30

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 115.

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y una carga biológicamente activa que es un anticuerpo que comprende una variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88 y una variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89.

35

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y una carga biológicamente activa que es un anticuerpo que comprende una variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 y una variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91

40

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y una carga biológicamente activa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 92.

45

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y una carga biológicamente activa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 93.

50

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y una carga biológicamente activa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 94.

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y una carga biológicamente activa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95.

55

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y una carga biológicamente activa que es un anticuerpo que comprende una variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 88 y una variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 89.

60

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 80 y una carga biológicamente activa que es un anticuerpo que comprende una variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 90 y una variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 91

65

En varias realizaciones, la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada que tiene la

Los siguientes ejemplos simplemente ilustran la divulgación y no se pretende que limiten la divulgación de ninguna manera.

Ejemplo 1

5 En este ejemplo, se describe de manera general la preparación de una molécula de fusión de origen no natural como una secuencia de aminoácidos única y que comprende una secuencia de toxina de Cholix modificada, una secuencia de conector escindible y una carga biológicamente activa.

10 Se construyen siete ejemplos de vectores de expresión de moléculas de fusión para administrar los polipéptidos interleucina-10 (SEQ ID NO: 82), interleucina-19 (SEQ ID NO: 83), interleucina-20 (SEQ ID NO: 84), interleucina-22 (SEQ ID NO: 85), interleucina-24 (SEQ ID NO: 86) o interleucina-26 (SEQ ID NO: 87) como se describe de manera general a continuación. Primero, los genes de polipéptidos se amplifican mediante PCR, incorporando parejas 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 la PCR se clonan en un plásmido apropiado para la expresión celular, que se digiere con las parejas de enzimas de restricción correspondientes. Los constructos resultantes comprenden una toxina de Cholix modificada que comprende una secuencia de aminoácidos que codifica los aminoácidos 1-386 de la SEQ ID NO: 1 (Cholix³⁸⁶) y los polipéptidos respectivos, y también están marcados con un motivo 6-His en el extremo N-terminal del polipéptido para facilitar la purificación. Los plásmidos finales se verifican mediante digestiones con enzimas de restricción y secuenciación de ADN.

20 También se preparó una molécula de fusión de origen no natural que comprende un Cholix⁴¹⁵ (SEQ ID NO: 52), una secuencia conectora escindible que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 121, y una carga biológicamente activa que es un polipéptido de IL-10 que consiste de los residuos de aminoácidos 20-178 de la SEQ ID NO: 82 (esta molécula de fusión se designa "Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10", ver la FIG. 1 (SEQ ID NO: 122)), y una molécula de fusión de origen no natural que comprende un Cholix⁴¹⁵ (SEQ ID NO: 52), una secuencia conectora no escindible que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 98, y una carga biológicamente activa que es un polipéptido de IL-10 que consiste de los residuos de aminoácidos 20-178 de la SEQ ID NO: 82 (esta molécula de fusión se designa "Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10", ver la FIG. 1 (SEQ ID NO: 123)).

25 Los vectores de expresión que comprenden conectores no escindibles o escindibles se construyen introduciendo secuencias que codifican la secuencia de aminoácidos apropiada. Para hacerlo, se sintetizan oligonucleótidos que codifican secuencias complementarias a los sitios de restricción apropiados y la secuencia de aminoácidos del conector deseado, luego se ligan en un vector de expresión preparado como se ha descrito con anterioridad entre la secuencia de Cholix modificada y la secuencia de polipéptido.

30 En varias realizaciones, las moléculas de fusión se expresan como sigue: Se transforman células competentes BL21 (DE3) pLysS de *E. coli* (Novagen, Madison, Wis.) usando un método estándar de choque térmico en presencia del plásmido apropiado para generar células de expresión de moléculas de fusión, se seleccionan en medio que contiene ampicilina, y se aíslan y cultivan en caldo Luria-Bertani (Difco; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) con antibiótico, luego se inducen para la expresión de proteínas mediante la adición de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM a DO 0,6. Dos horas después de la inducción de IPTG, las células se recogen mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min. Los cuerpos de inclusión se aíslan después de la lisis celular y las proteínas se solubilizan en el tampón que contiene Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), EDTA 2 mM, guanidina HCl 6 M y ditiotreititol 65 mM. La molécula de fusión solubilizada se repliega en presencia de Tris 0,1 M, pH=7,4, L-arginina 500 mM, GSSG 0,9 mM, EDTA 2 mM. Las proteínas replegadas se purifican mediante cromatografía de intercambio iónico de Q-sefarosa y cromatografía de filtración en gel Superdex 200 (Amersham Biosciences, Inc., Suecia). La pureza de las proteínas se evalúa mediante SDS-PAGE y HPLC analítica (Agilent, Inc. Palo Alto, Calif.).

35 La FIG. 2 es una representación en diagrama de cinta de una molécula de fusión ejemplar, por ejemplo, Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10 después del replegamiento que sería impulsado por la dimerización de IL-10. Se prevé que la dimerización de IL-10 dé como resultado la organización Cholix⁴¹⁵ púrpura/hIL-10 azul y Cholix⁴¹⁵ naranja/verde mostrada.

40 Se evaluaron Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10 y Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 para verificar el plegamiento apropiado con respecto a su tamaño molecular anticipado. Después de la inducción, se recogió la proteína expresada de los cuerpos de inclusión. El grado de expresión de Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10 (representado como "C" en el gel) y la expresión de Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 (representado como "N" en el gel) en cuerpos de inclusión mostró un peso molecular aparente de ~66 kDa que era comparable a la masa calculada de 66380,78 y 65958,25 Dalton, respectivamente. Ver la FIG. 3. Se muestra que la falta de estas proteínas en el medio sobrenadante después de la eliminación del cuerpo de inclusión para el conector TEV (Cs) y el conector no TEV (Ns) demuestra el grado y la especificidad de la inducción de quimeras. Se muestran los estándares de PM preteñido de SeeBlue® Plus2.

65

Ejemplo 2

Este ejemplo describe métodos *in vitro* 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.

5 Puede usarse la línea celular de macrófagos de ratón J774 como una línea celular que responde a IL-10 (O'Farrell AM, et al., EMBO J, 17(4):1006-18, 1998). La IL-10 forma de manera natural un dímero que se requiere para su actividad óptima. Se recogió Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 expresado por *E. coli* de los cuerpos de inclusión y se plegó usando un sistema de tampón de intercambio de disulfuro. El material resultante se purificó mediante intercambio iónico y cromatografía de exclusión por tamaño que dio como resultado el aislamiento de una proteína
10 de ~130 kDa, el tamaño anticipado de un dímero de IL-10 unido a dos moléculas de Cholix⁴¹⁵ (en lo sucesivo molécula de fusión de "dímero Cholix⁴¹⁵-IL-10"). La preparación tenía una pureza de proteína del ~85-90% basado en SDS PAGE. Los cultivos de la línea celular J774.2 se trataron durante 48 h con molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-IL-10 a concentraciones de 25 nM y 250 nM. En comparación con las células emparejadas no tratadas, la molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-IL-10 produjo una disminución dependiente de la dosis en el número de
15 células según se evaluó por citometría de flujo de células vivas/muertas (ver la FIG. 4). Los valores representan n=4 ± desviación estándar.

Alternativamente, se podrían cocultivar las células sensibles a IL-10 en el compartimento basal de las monocapas celulares usadas para la transición apical a basolateral (Rubas W, et al., Pharm Res. 13(1):23-6, 1996).
20

Ejemplo 3

25 En este ejemplo, se evaluó el efecto de la molécula de fusión del dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 sobre las propiedades de barrera de las monocapas de células Caco-2 *in vitro*. Las células Caco-2 (una línea celular derivada de cáncer de colon humano) con medio del compartimento basolateral que se muestrea periódicamente durante varias horas (Rubas W, et al., J Pharm Sci., 85(2):165-9, 1996). Las células Caco-2 (ATCC HTB-37™) se mantienen en CO₂ al 5% a 37° C en medio completo: medio F12 de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM F12) suplementado con suero bovino fetal al 10%, glutamina 2,5 mM, 100 U de penicilina/ml y 100 µg de estreptomicina/ml (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.). Las células se alimentan cada 2 a 3 días con este medio (designado medio completo) y se someten a pases cada 5 a 7 días. Para los ensayos, las células se siembran en placas de 24 o 96 pocillos y se cultivan hasta la confluencia.
30

35 Las monocapas de Caco-2 expuestas usadas para estos estudios tenían valores de resistencia eléctrica transepitelial (TER) de entre ~450-600 Ω·cm² (media de 579 Ω·cm²) como se mide con un voltímetro de palillo Millicell-ERS® (Millipore). Se añadieron dextrano de 70 kDa marcado con fluoresceína y concentraciones variables (4,7 nM, 23,6 nM y 236 nM) de molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 a la superficie apical de estas monocapas y la cantidad acumulada de la fluorescencia detectada en el compartimento basal se monitorizó a lo largo del tiempo mediante la recogida de volúmenes de 150 µl con sustitución. Como se representa en la FIG. 5 y la FIG. 6, en ausencia de células Caco-2 en el soporte del filtro, el dextrano se movió rápidamente desde el compartimento apical al basal. En comparación, la extensión del transporte de dextrano de 70 kDa fue mucho menor a través de las monocapas de Caco-2 y las varias moléculas de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-IL-10 no lograron tener ningún efecto dependiente de la dosis sobre la extensión del transporte de dextrano de 70 kDa a través de estas monocapas de Caco-2 y no fueron sorprendentemente diferentes de los resultados obtenidos con las monocapas de Caco-2 no expuestas a moléculas de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-IL-10. La molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 no afecta abiertamente a las propiedades de barrera de las monocapas de células Caco-2 *in vitro*.
40
45

Ejemplo 4

50 En este ejemplo, se realiza un ensayo ELISA para evaluar la capacidad de la molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 para moverse a través de las monocapas de células Caco-2. Las células A549 (ATCC CCL-185™), L929 (ATCC CRL-2148™) y Caco-2 (ATCC HTB-37™) se mantienen 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 µg de estreptomicina/ml (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.). Las células se alimentan cada 2 a 3 días con este medio (designado medio completo) y se someten a pases cada 5 a 7 días. Para los ensayos, las células se siembran en placas de 24 o 96 pocillos y se cultivan hasta la confluencia.
55

60 Las células Caco-2 se cultivan como monocapas confluentes en soportes transwell de membrana de policarbonato de tamaño de poro de 0,4 µm recubiertos de colágeno (Corning-Costar, Cambridge, MA) y se usan 18-25 días después de alcanzar una resistencia eléctrica transepitelial (TER) de >250Ω·cm² medido usando un voltímetro Millicell-ERS® de palillo (Millipore). El transporte apical a basolateral (A→B) de molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 a través de estas monocapas se determina midiendo la cantidad de proteína transportada 4 horas después de una aplicación de 4,7 nM, 23,6 nM y 236 nM a 37° C. Se usan mediciones de TER y la extensión 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 de
65

Cholix se determina por titulación de los medios recogidos en el ensayo de citotoxicidad basado en células. La molécula de fusión de dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 transportada se mide mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando anticuerpo anti-IL-10 para la captura y los sueros policlonales a Cholix para la detección. Como se muestra en la FIG. 7(A y B), la molécula de fusión del dímero Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 se mueve a través de las monocapas de células Caco-2.

Ejemplo 5

En este ejemplo, se describe la preparación de una molécula de fusión de origen no natural que carece de una secuencia escindible. Estas moléculas de fusión están diseñadas para apuntar específicamente al espacio submucosal/GI y limitar las acciones de la carga biológicamente activa en ese espacio.

Se prepara un constructo de plásmido que codifica la forma mutante no tóxica de la toxina de Cholix, toxina de Cholix ΔE581 (SEQ ID NO: 81). La expresión de proteínas se logra usando células DH5α de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA) después de la transformación por choque térmico (1 min a 42° C) con el plásmido apropiado. Las células transformadas, seleccionadas en medios que contienen antibióticos, se aíslan y se cultivan en caldo Luria-Bertani (Difco). La expresión de proteínas se induce mediante la adición de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. Dos horas después de la inducción de IPTG, las células se recogen por centrifugación a 5000 xg durante 10 min a 4° C. Los cuerpos de inclusión se aíslan después de la lisis celular y las proteínas se solubilizan en guanidina HCl 6 M y EDTA 2 mM (pH 8,0) más ditiotretitol 65 mM. Después del repliegamiento y la purificación, las proteínas se almacenan a ~5 ml/ml en PBS (pH 7,4) que carece de Ca²⁺ y Mg²⁺ a -80° C. Se confirma que todas las proteínas usadas en estos estudios tienen una pureza >90% en base a la cromatografía de exclusión por tamaño.

La proteína de la toxina de Cholix ΔE581 se modifica luego en su extremo C-terminal para permitir el acoplamiento químico directo a través de un residuo sulfhidrilo libre localizado cerca del extremo C-terminal de la proteína. La modificación C-terminal incluye un giro restringido por cisteína que alberga la secuencia de escisión de consenso para la proteasa altamente selectiva del virus del grabado del tabaco (TEV), una segunda cisteína y una etiqueta de hexahistadina (His₆). La segunda Cys se incluye para formar un puente de disulfuro con la Cys usada en última instancia para el acoplamiento. Añadir la secuencia de His₆ a la proteína simplifica la purificación y la secuencia de escisión de TEV proporciona un mecanismo para eliminar selectivamente el residuo de Cys terminal después de una reducción suave. La escisión de TEV y la reducción suave con ditiotretitol 0,1 mM después de la expresión y el aislamiento de los constructos ntCholix permiten el acoplamiento químico directo de una carga biológicamente activa a través de una reacción basada en maleimida como un mecanismo genérico de unión de carga. Después de la escisión, reducción y acoplamiento de carga de la proteasa TEV a través de una reacción de maleimida con el sulfhidrilo libre, se logró la eliminación de la secuencia C-terminal liberada mediante un segundo paso de cromatografía en columna de Ni²⁺.

Ejemplo 6

El transporte transepitelial de la toxina de Cholix ΔE581-carga se evalúa usando monocapas de Caco-2 *in vitro*. Las células Caco-2 (número de pases 25-35) se cultivan hasta monocapas confluentes como se ha descrito con anterioridad; Rubas, W. et al., Pharm Res, 10:113-118 (1993). Brevemente, las células se mantienen a 37° C en DMEM/media de alto crecimiento enriquecido con L-glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10%, y 100 unidades de penicilina/estreptomina en una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. Las células se someten a pases cada semana en una proporción de división de 1:3 en matraces de 75 cm² y se siembran sobre soportes de filtro de policarbonato (Transwell™) permeables recubiertos de colágeno (tamaño de poro de 0,4 μm) y prehumedecidos de Corning Costar (Cambridge, MA) a una densidad de 63.000 células/cm². El medio de crecimiento se reemplaza cada dos días. Las monocapas confluentes, determinadas por la adquisición de una resistencia transepitelial significativa (TEER) determinada usando un voltímetro-ohmímetro (World Precision Instruments, Sarasota, FL), se usan 20-26 días después de la siembra.

Las velocidades de flujo de transporte transepitelial se miden *in vitro* en las direcciones apical (Ap) a basolateral (Bl) y Bl a Ap usando monocapas polarizadas de células Caco-2 para describir eventos de flujo mucosa a serosa y serosa a mucosa, respectivamente. Justo antes de iniciar un estudio de transporte, se mide la resistencia transepitelial (TEER) de cada filtro; las lecturas TEER de monocapas de <200 Ω·cm² están excluidas del estudio. El medio Ap y Bl se elimina de las monocapas incluidas y estas superficies se lavan una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Luego, un conjunto de monocapas recibe una aplicación de Ap (donante) de 100 μl de PBS que contiene 10 μg de toxina Cholix ΔE581-carga y 10 μg de TRITC-Dextrano o 10 μg de BSA-carga y 10 μg de TRITC-Dextrano. Los compartimentos del receptor (Bl) reciben 500 μl de PBS para configurar el T₀ para el estudio de transporte. Se toman muestras de los compartimentos tanto donante como receptor después de 4 horas de incubación a 37° C para determinar la cantidad de material transportado a través de la monocapa y la cantidad retenida en la superficie apical, respectivamente.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe la preparación y expresión en *E. coli* de una molécula de fusión que comprende una toxina de Cholix modificada que comprende una secuencia que codifica los aminoácidos 1-415 de la SEQ ID NO: 1 fusionada directamente en su extremo C-terminal a un polipéptido de IL-10 (denominado "molécula de fusión Cholix⁴¹⁵-IL-10"). La expresión de proteínas se logra usando células de *E. coli* DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA) después de la transformación por choque térmico (1 min a 42^o C) con el plásmido apropiado. Las células transformadas, seleccionadas en medios que contienen antibióticos, se aíslan y se cultivan en caldo Luria-Bertani (Difco). La expresión de proteínas se induce mediante la adición de isopropil-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM. Dos horas después de la inducción de IPTG, las células se recogen por centrifugación a 5000 xg durante 10 min a 4^o C. Los cuerpos de inclusión se aíslan después de la lisis celular y las proteínas se solubilizan en guanidina HCl 6 M y EDTA 2 mM (pH 8,0) más ditiotretitol 65 mM. Después del replegamiento y la purificación, las proteínas se almacenan a ~5 ml/ml en PBS (pH 7,4) que carece de Ca²⁺ y Mg²⁺ a -80^o C. Se confirmó que todas las proteínas usadas en estos estudios tenían una pureza >90% en base a la cromatografía de exclusión por tamaño.

Se obtienen perlas de poliestireno (10 nm de diámetro) que contienen un colorante rojo fluorescente integrado covalentemente con propiedades de excitación/emisión de 468/508 nm y que tienen grupos funcionales de superficie de aldehído (XPR-582) de Duke Scientific (Palo Alto, CA). Se mezclan cien μ l de perlas XPR-582 (al 2% de sólidos) con aproximadamente 2,5 nmoles de IL-10 o molécula de fusión Cholix⁴¹⁵-IL-10 en un volumen final de 200 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) neutra (pH 7,0). Después de 2 horas de oscilación suave a temperatura ambiente, se añaden 20 μ l de una solución de 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, St. Louis, MO) en PBS. Luego las preparaciones se dializan mediante tres ciclos de dilución con PBS y concentración usando un dispositivo de filtro Microcon con corte de peso molecular de 100.000 de Millipore (Bedford, MA). Las preparaciones finales de perlas recubiertas tenían un 1% de sólidos.

Ejemplo 8

En este ejemplo, se preparan moléculas de fusión aisladas de origen no natural que comprenden la secuencia de toxina de Cholix modificada de la SEQ ID NO: 52 (Cholix⁴¹⁵), una secuencia de conector escindible (SEQ ID NO: 98) o un conector no escindible (SEQ ID NO: 98), y una carga biológicamente activa que es un inhibidor de TNFSF como se describe en el Ejemplo 1, y se evalúan como se describe en los Ejemplos anteriores para confirmar el plegado adecuado, el tamaño adecuado,

Se prepararon seis vectores de expresión de moléculas de fusión ejemplares (3 para cada conector) para probar la capacidad de las moléculas de fusión para transportar de apical a basal a través de células epiteliales un inhibidor de TNFSF seleccionado de: 1) un inhibidor de TNF que es un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 88 y 89; 2) un inhibidor de TNF que es un anticuerpo que comprende las secuencias de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera de las SEQ ID NO: 90 y 91; y 3) un inhibidor de TNFSF que es un dímero de un TNFR-p75 humano soluble con la porción Fc de IgG que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 92.

Ejemplo 9

En este ejemplo, se preparan moléculas de fusión aisladas de origen no natural que comprenden la secuencia de toxina de Cholix modificada de la SEQ ID NO: 52 (Cholix⁴¹⁵), una secuencia de conector escindible (SEQ ID NO: 121) o un conector no escindible (SEQ ID NO: 98), y una carga biológicamente activa que es un agente reductor de glucosa como se describe en el Ejemplo 1, y se evalúan como se describe en los Ejemplos anteriores para confirmar el plegado adecuado, el tamaño adecuado,

Se prepararon cuatro ejemplos de vectores de expresión de moléculas de fusión (2 para cada conector) para probar la capacidad de las moléculas de fusión para transportar de apical a basal a través de células epiteliales un agente reductor de glucosa seleccionado de: 1) un agonista de GLP-1 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 93; y 2) un agonista de GLP-1 que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 94.

Ejemplo 10

En este ejemplo, se prepararon moléculas de fusión aisladas de origen no natural que comprenden la secuencia de toxina de Cholix modificada de la SEQ ID NO: 52 (Cholix⁴¹⁵), una secuencia de conector escindible (SEQ ID NO: 98) o un conector no escindible (SEQ ID NO: 98), y una carga biológicamente activa que es una hormona del crecimiento humana como se describe en el Ejemplo 1, y se evalúan como se describe en los Ejemplos anteriores para confirmar el plegado adecuado, el tamaño adecuado,

Se prepararon dos vectores de expresión de moléculas de fusión ejemplares (uno para cada conector) para probar la capacidad de las moléculas de fusión para transportar de apical a basal a través de células epiteliales una hormona del crecimiento humano que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 95.

Ejemplo 11

Este ejemplo describe la detección histológica en tejidos de una carga biológicamente activa representativa de las moléculas de fusión preparadas en el Ejemplo 1. Después de la administración de una molécula de fusión, los animales se sacrificaron mediante asfixia con CO₂ y se exanguinaron mediante punción cardíaca. Se extraen tejidos específicos (ganglios linfáticos, tráquea, cerebro, bazo, hígado, tracto gastrointestinal), se enjuagan brevemente en PBS para eliminar cualquier resto de sangre y se congelan en OCT. Se colocan secciones (de 5 micras de espesor) en portaobjetos. Los portaobjetos se fijan en acetona durante 10 min y se enjuagan con PBS. Los portaobjetos se incuban con peroxidasa al 3% durante 5 min. Luego, se bloquean los portaobjetos con proteína durante 5 min adicionales. El anticuerpo primario para la carga biológicamente activa respectiva se incuba sobre los portaobjetos durante 30 min a una dilución de 1:100 seguido de lavados con PBS. Luego, el anticuerpo secundario marcado con biotina se incuba durante aproximadamente 15 minutos seguido de lavados con PBS. La etiqueta de estreptavidina HRP se incuba sobre los portaobjetos durante 15 minutos seguido de lavados con PBS. Se aplica cromógeno HRP durante 5 min seguido de varios enjuagues en H₂O destilada. Finalmente, los portaobjetos se contratiñen con hematoxilina durante 1 minuto, se cubren con un cubreobjetos y se examinan para detectar la presencia de la carga biológicamente activa.

Las moléculas de fusión de la divulgación ofrecen varias ventajas sobre las técnicas convencionales para la administración local o sistémica de macromoléculas a un sujeto. La principal de estas ventajas es la capacidad de administrar la carga biológicamente activa a un sujeto sin usar una aguja para perforar la piel del sujeto. Muchos sujetos requieren dosis regulares y repetidas de macromoléculas. Por ejemplo, los diabéticos deben inyectarse insulina varias veces al día para controlar las concentraciones de azúcar en sangre. La calidad de vida de tales sujetos mejoraría enormemente si la administración de una macromolécula pudiera lograrse sin inyección, evitando el dolor o las posibles complicaciones asociadas con el mismo.

Además, el acoplamiento de la carga biológicamente activa al resto de la molécula de fusión con un conector que es escindido por una enzima presente en una membrana basolateral de una célula epitelial permite que la carga biológicamente activa se libere de la molécula de fusión y se libere del resto de la molécula de fusión poco después de la transcitosis a través de la membrana epitelial. Tal liberación reduce la probabilidad de inducción de una respuesta inmune contra la carga biológicamente activa. También permite que la carga biológicamente activa interactúe con su objetivo libre del resto de la molécula de fusión.

Además, las moléculas de fusión de origen no natural que carecen de un conector escindible pueden ser ventajosas porque el efecto de anclaje de la toxina de Cholix modificada por su receptor o receptores en la superficie de, por ejemplo, células inmunes que también expresan el receptor para la carga biológicamente activa (pero en una cantidad considerablemente menor) puede permitir una mayor exposición de la carga biológicamente activa en la superficie de las células objetivo y proporcionar un efecto sinérgico a través de la unión de Cholix a su receptor y, por ejemplo, la unión de IL-10 al IL-10R.

Además, una vez transportadas a través del epitelio del GI, las moléculas de fusión de la divulgación mostrarán una vida media extendida en suero, es decir, la carga biológicamente activa de las moléculas de fusión mostrará una vida media extendida en suero en comparación con la carga biológicamente activa en su estado no fusionado, y la administración oral de la molécula de fusión puede proporcionar una concentración eficaz más alta de la carga biológicamente activa administrada al hígado del sujeto que la observada en el plasma del sujeto.

Además, las realizaciones de las moléculas de fusión pueden construirse y expresarse en sistemas recombinantes. La tecnología recombinante permite elaborar una molécula de fusión que tiene un sitio de inserción diseñado para la introducción de cualquier carga biológicamente activa adecuada. Tales sitios de inserción permiten al experto en la técnica producir rápida y fácilmente moléculas de fusión para la administración de nueva carga biológicamente activa, en caso de que surja la necesidad de hacerlo.

Listados de secuencias

Las secuencias de aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias acompañante se muestran usando un código estándar de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R 1.822.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia de 634 aminoácidos de la toxina de Cholix de *Vibrio cholera* madura.

La SEQ ID NO: 2 es una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de 634 aminoácidos de la toxina de Cholix de *V. cholera* madura.

Las SEQ ID NO: 3-80 son las secuencias de aminoácidos de varias toxinas de Cholix truncadas derivadas de la secuencia de toxina de Cholix madura expuesta en la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 81 es la secuencia de aminoácidos de una toxina de Cholix mutada en la que se ha eliminado el residuo de aminoácidos E581 de la SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 82 es la secuencia de aminoácidos de la interleucina-10 humana (IL-10).

La SEQ ID NO: 83 es la secuencia de aminoácidos de la interleucina-19 humana (IL-19).

La SEQ ID NO: 84 es la secuencia de aminoácidos de la interleucina-20 humana (IL-20).

La SEQ ID NO: 85 es la secuencia de aminoácidos de la interleucina-22 humana (IL-22).
 La SEQ ID NO: 86 es la secuencia de aminoácidos de la interleucina-24 humana (IL-24).
 La SEQ ID NO: 87 es la secuencia de aminoácidos de la interleucina-26 humana (IL-26).
 SEQ ID NO: 88 - secuencia de la región variable de la cadena pesada para un anticuerpo anti-TNF-alfa.
 SEQ ID NO: 89 - secuencia de la región variable de la cadena ligera para un anticuerpo anti-TNF-alfa.
 SEQ ID NO: 90 - secuencia de la región variable de la cadena pesada para un anticuerpo anti-TNF-alfa.
 SEQ ID NO: 91 - secuencia de la región variable de la cadena ligera para un anticuerpo anti-TNF-alfa.
 SEQ ID NO: 92 - secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión dimérica TNFR-p75-Fc humana.
 SEQ ID NO: 93 - secuencia de aminoácidos del péptido agonista de GLP-1 (exenatida)
 SEQ ID NO: 94 - secuencia de aminoácidos del péptido agonista de GLP-1 (liraglutida)
 SEQ ID NO: 95 - secuencia de aminoácidos de la hormona del crecimiento humana (somatotropina)
 Las SEQ ID NO: 96-121 son las secuencias de aminoácidos de varios conectores peptídicos
 La SEQ ID NO: 122 es la secuencia de aminoácidos de una molécula de fusión Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10.
 La SEQ ID NO: 123 es la secuencia de aminoácidos de una molécula de fusión Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10.

LISTADOS DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* madura

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPMTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVNWTYQELEATHQAL
 TREGYVFGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGARIKEGTG
 EYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSPLRNEAFTGPESA
 GGEDET VIGWDMIAHVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK

SEQ ID NO: 2 – secuencia de aminoácidos que codifica la toxina de Cholix de *V. cholera* madura

ATGGTGAAGAAGCTTTAAACATCTTTGATGAATGCCGTCGCCATGTTGTTGACCCCGGAACCGG
 GTAAGCCGATTCAATCAAACTGTCTATCCCTAGTGATGTTGTTCTGGATGAAGGTGTTCTGTATTAC
 TCGATGACGATTAATGATGAGCAGAATGATATTAAGGATGAGGACAAAGGCGAGTCCATTATCACTAT
 TGGTGAATTTGCCACAGTACGCGGACTAGACATTATGTTAATCAAGATGCGCCTTTTGGTGTCTATCC
 ATTTAGATATTACGACAGAAAATGGTACAAAACGTACTCTTATAACCGCAAAGGGTGAATTTGCA
 ATCAATTTGGTATGTCCTATTGGTGAAGATTCTCCTGCAAGCATCAAAATCCCGTTGAGCTCGA
 TCAGCAACGCAATATCATCGAGGTGCCTAACTGTATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTTAGAGC
 AGTGGAAAACCCAAGGTAATGTTTTCTTTTTCGGTAACGCGTCTGAAACATAATATCGCTATCTCTTGG
 CCAAGCGTGAGTTACAAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTTCACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGGCAT
 ACAGGCTTAGCACTGTGTTGGCTTGTGCCAATGGATGCTATCTATAACTATATCACCCAGCAAATTG
 TACTTTAGGGGATAAATTGTTTGGTGGCTCTTATGAGACTGTTGCAGGCACTCCGAAGGTGATTACG
 GTTAAGCAAGGGATTGAACAAAAGCCAGTTGAGCAGCGCATCCATTTCTCCAAGGGGAATGCGATGA
 GCGCACTTGCTGCTCATCGCGTCTGTGGTGTGCCATTAGAACTTTGGCGCGCAGTCGCAAACCTC
 GTGATCTGACGGATGATTTATCATGTGCCTATCAAGCGCAGAATATCGTGAGTTTTATTTGTCGCGAGC
 CGTATCCTGTTCTCTCATCTGGATAGCGTATTTACTCTGAATCTTGACGAACAAGAACCAGAGGTGGC
 TGAACGTCTAAGTGATCTTCGCCGATCAATGAAAATAACCCGGGCATGGTTACACAGTTTTAACC
 GTTGCTCGTCAGATCTATAACGATTATGTCACTCACCATCCGGGCTTAACTCCTGAGCAAACCAAGTG
 CGGGTGCACAAGCTGCCGATATCCTCTCTTTATTTTGGCCAGATGCTGATAAGTCTTGTGTGGCTTCA
 AACAACGATCAAGCCAATATCAACATCGAGTCTCGTTCTGGCCGTTTCAATTTGCCTGAAAACCGTGC
 GGTAATCACCCCTCAAGGCGTCACAAATTGGACTTACCAGGAACTCGAAGCAACACATCAAGCTCTG
 ACTCGTGAGGGTTATGTGTTCTGGGTTACCATGGTACGAATCATGTCGCTGCGCAAACCATCGTGA
 ATCGCATTGCCCTGTTCCGCGCGGCAACAACACTGAAAACGAGGAAAAGTGGGGCGGGTTATATG
 TTGCAACTCACGCTGAAGTTGCCCATGGTTATGCTCGCATCAAAGAAGGGACAGGGGAGTATGGCC

TTCCGACCCGTGCTGAGCGCGACGCTCGTGGGGTAATGCTGCGCGGTGTATATCCCTCGTGCTTCAT
 TAGAACGTTTTTATCGCACGAATACACCTTTGGAAAATGCTGAGGAGCATATCACGCAAGTGATTGGT
 5 CATTCTTTGCCATTACGCAATGAAGCATTTACTGGTCCAGAAAAGTGCGGGCGGGGAAGACGAAACTG
 TCATTGGCTGGGATATGGCGATTGATGCAGTTGCGATCCCTTCGACTATCCAGGGAACGCTTACGA
 AGAATTGGCGATTGATGAGGAGGCTGTTGCAAAGAGCAATCGATTAGCACAAAACCACCTTATAAA
 GAGCGCAAAGATGAACTTAAG

10 SEQ ID NO: 3 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸⁶

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 15 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ
 A

20 SEQ ID NO: 4 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸⁵

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 25 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ

30 SEQ ID NO: 5 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸⁴

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 35 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA

40 SEQ ID NO: 6 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸³

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 45 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAG

50 SEQ ID NO: 7 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸²

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 55 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSASA

60 SEQ ID NO: 8 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸¹

65

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 5 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTS

10 SEQ ID NO: 9 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸⁰

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 15 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQT

20 SEQ ID NO: 10 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷⁹

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 25 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ

30 SEQ ID NO: 11 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷⁸

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 35 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPE

40 SEQ ID NO: 12 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷⁷

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 45 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTP

50 SEQ ID NO: 13 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷⁶

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 55 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLT

60 SEQ ID NO: 14 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷⁵

65

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 5 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGL

10 SEQ ID NO: 15 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷⁴

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 15 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPG

20 SEQ ID NO: 16 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷³

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 25 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHP

30 SEQ ID NO: 17 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷²

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 35 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHH

40 SEQ ID NO: 18 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷¹

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 45 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTH

50 SEQ ID NO: 19 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁷⁰

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 55 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT

60 SEQ ID NO: 20 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶⁹

65

5 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYV

10 SEQ ID NO: 21 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶⁸

15 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDY

20 SEQ ID NO: 22 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶⁷

25 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYND

30 SEQ ID NO: 23 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶⁶

35 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYN

40 SEQ ID NO: 24 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶⁵

45 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIY

50 SEQ ID NO: 25 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶⁴

55 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQI

60 SEQ ID NO: 26 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶³

65

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 5 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQ

10 SEQ ID NO: 27 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶²

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 15 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVAR

20 SEQ ID NO: 28 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶¹

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 25 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVA

30 SEQ ID NO: 29 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁶⁰

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 35 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTV

40 SEQ ID NO: 30 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵⁹

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 45 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLT

50 SEQ ID NO: 31 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵⁸

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 55 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVL

60 SEQ ID NO: 32 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵⁷

65

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 5 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQV

10 SEQ ID NO: 33 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵⁶

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 15 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQ

20 SEQ ID NO: 34 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵⁵

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 25 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT

30 SEQ ID NO: 35 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵⁴

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 35 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMV

40 SEQ ID NO: 36 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵³

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 45 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGM

50 SEQ ID NO: 37 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵²

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 55 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPG

60 SEQ ID NO: 38 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵¹

65

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 5 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP

10 SEQ ID NO: 39 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁵⁰

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 15 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN

20 SEQ ID NO: 40 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁴⁹

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 25 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN

30 SEQ ID NO: 41 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁴⁸

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 35 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINE

40 SEQ ID NO: 42 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴²⁵

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 45 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 50 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPEN

SEQ ID NO: 43 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴²⁴

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 55 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 60 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNP
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPEN

SEQ ID NO: 44 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴²³

65

5 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 10 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLP

SEQ ID NO: 45 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴²²

15 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 20 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYL

SEQ ID NO: 46 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴²¹

25 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 30 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY

35 SEQ ID NO: 47 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴²⁰

40 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 45 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS

SEQ ID NO: 48 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹⁹

50 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 55 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGR

SEQ ID NO: 49 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹⁸

60 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 65 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSG

ES 2 900 328 T3

SEQ ID NO: 50 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹⁷

5 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
10 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRS

SEQ ID NO: 51 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹⁶

15 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
20 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESR

SEQ ID NO: 52 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹⁵

25 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
30 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES

SEQ ID NO: 53 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹⁴

35 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
40 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIE

SEQ ID NO: 54 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹³

50 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
55 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINI

SEQ ID NO: 55 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹²

60

65

5 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLD
 10 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANIN

SEQ ID NO: 56 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹¹

15 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLD
 20 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANI

SEQ ID NO: 57 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴¹⁰

25 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLD
 30 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQAN

SEQ ID NO: 58 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰⁹

35 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLD
 40 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQA

SEQ ID NO: 59 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰⁸

45 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLD
 50 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQ

SEQ ID NO: 60 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰⁷

55 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSHLD
 60 SVFTLNLDQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ
 AADILSLFCPDADKSCVASNND

SEQ ID NO: 61 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰⁶

5 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 10 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSLFCPDADKSCVASN

SEQ ID NO: 62 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰⁵

15 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 20 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSLFCPDADKSCVASN

SEQ ID NO: 63 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰⁴

25 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 30 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSLFCPDADKSCVAS

SEQ ID NO: 64 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰³

35 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 40 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSLFCPDADKSCVA

SEQ ID NO: 65 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰²

45 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 50 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 55 AADILSLFCPDADKSCV

SEQ ID NO: 66 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰¹

60 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDTTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 65 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSLFCPDADKSC

ES 2 900 328 T3

SEQ ID NO: 67 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix⁴⁰⁰

5 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
10 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
AADILSLFCPDADKS

SEQ ID NO: 68 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹⁹

15 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
20 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
AADILSLFCPDADK

SEQ ID NO: 69 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹⁸

25 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
30 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
AADILSLFCPDAD

SEQ ID NO: 70 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹⁷

35 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
40 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
AADILSLFCPDA

SEQ ID NO: 71 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹⁶

45 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
ELDQQRNIIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
50 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIIVSLFVATRILFSLD
SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
AADILSLFCPD

SEQ ID NO: 72 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹⁵

60

65

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 5 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 10 AADILSLFCP

SEQ ID NO: 73 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹⁴

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 15 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 20 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSLFC

SEQ ID NO: 74 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹³

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 25 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 30 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSLF

SEQ ID NO: 75 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹²

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 35 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 40 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILSL

SEQ ID NO: 76 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹¹

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 45 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 50 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 AADILS

SEQ ID NO: 77 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁹⁰

VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 55 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 60 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNVSLFVATRILFSHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
 65 AADIL

SEQ ID NO: 78 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸⁹

5 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 10 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILF SHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
 AADI

SEQ ID NO: 79 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸⁸

15 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 20 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILF SHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
 AAD

SEQ ID NO: 80 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix³⁸⁷

25 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 30 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILF SHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
 AA

SEQ ID NO: 81 - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix de *Vibrio Cholera* modificada Cholix Δ581

35 VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITI
 GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVD
 ELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
 40 RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE
 QRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILF SHLD
 SVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA Q
 AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWVTYQELEATHQAL
 45 TREGYVFGYHGTHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHG YARIKEGTG
 EYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESA
 GGEDTVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEA VAKEQSISTKPPYKERKDELK

SEQ ID NO: 82 – secuencia de aminoácidos de interleucina-10 humana

50 MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLD
 NLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKT LRLRLRRC
 HRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

SEQ ID NO: 83 - secuencia de aminoácidos de interleucina-19 humana

55 MKLQCVSLWLLGTILILCSVDNHGLRRCLISTDMHHIEESFQEIKRAIQAKDTFPNVITLSTLET LQ
 IIKPLDVCCVTKNLLAFYVDRVFKDHQEPNPKILRKISSIANSFLYMQKTLRQCQEQRQCHCRQE
 60 ATNATRVI HDNYDQLEVHAAA IKS LGELDVFLAWINKNHEVMSSA

SEQ ID NO: 84 - secuencia de aminoácidos de interleucina-20 humana

65

5 MKASSLAFSLLSAAFYLLWTPSTGLKTLNLGSCVIATNLQEIRNGFSEIRGSVQAKDGNIDIRILR
RTESLQDTK PANRCCLLRHLLRLYLDRVFNKYQTPDHYTLRKISSLANSFLT IKKDLRLCHAHMT
CHCGEEAMK KYSQILSHFEKLEPQAAVVKALGELDILLQWMEETE

SEQ ID NO: 85 - secuencia de aminoácidos de interleucina-22 humana

10 MAALQKSVSSFLMGLTATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRDKSNFQQPYITNRTFMLAKEAS
LADNNTDVRLIGEKL FHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSN
RLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

SEQ ID NO: 86 - secuencia de aminoácidos de interleucina-24 humana

15 MNFQQRLQSLWTLASRPFCPPLLATASQMOMVVLPCLGFTLLWSQVSGAQQQEFHFGPCQ
VKGVVPQKLWEAFWAVKDTMQAQDNITSARLLQQEVLQNVSDAESCYLVHTLLEFYLKTVFKN
YHNRTVEVRTLKSFSTLANNFVLIVSQLQPSQENEMFSIRDSAHRRFLLFRRAFKQLDVEAALT
KALGEVDILLTWMQKFYKL

SEQ ID NO: 87 - secuencia de aminoácidos de interleucina-26 humana

20 MLVNFILRCGLLVTLSLAIKHKQSSFTKSCYPRGTL SQAVDALYIKAAWLKATIPEDRIKNIRLL
25 KKKTKKQFMKNCQFQEQLLSFFMEDVFGQLQLQGCKIRFVEDFHSLRQKLSHCISCASSARE
MKSITRMKRIFYRIGNKGIYKAISELDILLSWIKKLESSQ

SEQ ID NO: 88 - región variable de la cadena pesada para un anticuerpo anti-TNF-alfa

30 EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYA
DSVERGFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLVTVSSAST
35 KGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC

SEQ ID NO: 89 - región variable de la cadena ligera para un anticuerpo anti-TNF-alfa

40 DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGI RNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASLTQSGVPSRFSG
SGSGTDFLT ISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 90 - región variable de la cadena pesada para un anticuerpo anti-TNF-alfa

45 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAISFDGNSNKSSAD
SVKGRFTYSRRNSKNALFLQMNSLRAEDTAVFYCARDRGVSAGGNYYYYYGM DVWGQGTITV
VSS

SEQ ID NO: 91 - región variable de la cadena ligera para un anticuerpo anti-TNF-alfa

50 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSG
55 SGSGTRFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPPFTFGPGTKVDIL

SEQ ID NO: 92 - secuencia de aminoácidos de proteína de fusión dimérica TNFR-p75-Fc humana

60 LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYT
QLWNWVPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRP
GFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFNNTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSPTRS
MAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMPGSPPAEGSTGDEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
65 REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ES 2 900 328 T3

- SEQ ID NO: 93 - Secuencia de aminoácidos de péptido agonista de GLP-1 (exenatida)
HGEFTFTSDLKQMEEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS
- 5 SEQ ID NO: 94 - Secuencia de aminoácidos de péptido agonista de GLP-1 (Liraglutida)
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEEFIIAWLVKGRG
- SEQ ID NO: 95 - secuencia de aminoácidos de hormona de crecimiento humana (somatotropina)
- 10 FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNRE
ETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLED
GSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
- 15 SEQ ID NO: 96 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
GGGGS
- SEQ ID NO: 97 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
GGGSGGGGS
- 20 SEQ ID NO: 98 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
GGGSGGGSGGGGS
- SEQ ID NO: 99 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
GGGSGGG
- 25 SEQ ID NO: 100 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
AAPF
- 30 SEQ ID NO: 101 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
GGF
- SEQ ID NO: 102 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
AAPV
- 35 SEQ ID NO: 103 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
GGL
- SEQ ID NO: 104 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
AAL
- 40 SEQ ID NO: 105 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
FVR
- 45 SEQ ID NO: 106 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
VGR
- SEQ ID NO: 107 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
RKPR
- 50 SEQ ID NO: 108 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
Y V A D Xaa Xaa = cualquier aminoácido
- SEQ ID NO: 109 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
D Xaa Xaa D Xaa Xaa = cualquier aminoácido
- 55 SEQ ID NO: 110 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
R (Xaa)_n R Xaa Xaa = cualquier aminoácido n = 0, 2, 4 o 6
- 60 SEQ ID NO: 111 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
K (Xaa)_n R Xaa Xaa = cualquier aminoácido n = 0, 2, 4 o 6
- SEQ ID NO: 112 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
E R T K R Xaa Xaa = cualquier aminoácido
- 65

ES 2 900 328 T3

SEQ ID NO: 113 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
R V R R Xaa Xaa = cualquier aminoácido

5 SEQ ID NO: 114 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
Decanoil-R V R R Xaa Xaa = cualquier aminoácido

SEQ ID NO: 115 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
P Xaa W V P Xaa Xaa = cualquier aminoácido

10 SEQ ID NO: 116 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
W V A Xaa Xaa = cualquier aminoácido

15 SEQ ID NO: 117 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
Xaa F Xaa Xaa Xaa = cualquier aminoácido

SEQ ID NO: 118 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
Xaa Y Xaa Xaa Xaa = cualquier aminoácido n = 0, 2, 4 o 6

20 SEQ ID NO: 119 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
Xaa W Xaa Xaa Xaa = cualquier aminoácido n = 0, 2, 4 o 6

SEQ ID NO: 120 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
D R W I P F H L L en combinación con (V, A o P)-Y-(S, P o A)

25 SEQ ID NO: 121 - secuencia de aminoácidos de un conector peptídico
GGGGSGGGENLYFQS

SEQ ID NO: 122 - secuencia de aminoácidos de una Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10 molécula de fusión

30 MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDDEGVLYYSMTINDEQNDIKDED
KGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPAGEDSPA
SIKISIDELDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE
35 GSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQ
KPVEQRIHFSSKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFT
HIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPADKSCVASNSDQANINIESGGGGSGGGENLYFQSPGQGTQSENSCTHFPG
40 NLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCALSEMIQFYLEEVMPPQA
ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF
DIFINYIEAYMTMKIRN

SEQ ID NO: 123 - secuencia de aminoácidos de una Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10 molécula de fusión

45 MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDDEGVLYYSMTINDEQNDIKDED
KGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPAGEDSPA
SIKISIDELDQQRNIIIVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE
50 GSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQ
KPVEQRIHFSSKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFT
HIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGA
QAADILSLFCPADKSCVASNSDQANINIESGGGGSGGGGSGGGGSPGQGTQSENSCTHFPG
55 NLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCCALSEMIQFYLEEVMPPQA
ENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEF
DIFINYIEAYMTMKIRN

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> APPLIED MOLECULAR TRANSPORT LLC
<120> MOLÉCULAS DE FUSIÓN DERIVADAS DE TOXINA DE CHOLIX PARA LA ADMINISTRACIÓN ORAL
DE CARGA BIOLÓGICAMENTE ACTIVA

65 <130> CACAM1.0002WO
<160> 123

ES 2 900 328 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

5 <211> 634

<212> PRT

<213> Vibrio cholerae - secuencia de aminoácidos de toxina de Cholix madura

<400> 1

10

Val Glu Asp Glu 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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

ES 2 900 328 T3

5 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

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

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

30 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270

35 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285

40 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

45 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

50 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

65 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380

70 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
385 390 395 400

75 Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
405 410 415

80 Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn Arg Ala Val Ile Thr Pro Gln
420 425 430

85

ES 2 900 328 T3

Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu Leu Glu Ala Thr His Gln Ala
 435 440 445
 5
 Leu Thr Arg Glu Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Asn His
 450 455 460
 10
 Val Ala Ala Gln Thr Ile Val Asn Arg Ile Ala Pro Val Pro Arg Gly
 465 470 475 480
 15
 Asn Asn Thr Glu Asn Glu Glu Lys Trp Gly Gly Leu Tyr Val Ala Thr
 485 490 495
 20
 His Ala Glu Val Ala His Gly Tyr Ala Arg Ile Lys Glu Gly Thr Gly
 500 505 510
 25
 Glu Tyr Gly Leu Pro Thr Arg Ala Glu Arg Asp Ala Arg Gly Val Met
 515 520 525
 30
 Leu Arg Val Tyr Ile Pro Arg Ala Ser Leu Glu Arg Phe Tyr Arg Thr
 530 535 540
 35
 Asn Thr Pro Leu Glu Asn Ala Glu Glu His Ile Thr Gln Val Ile Gly
 545 550 555 560
 40
 His Ser Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala Phe Thr Gly Pro Glu Ser Ala
 565 570 575
 45
 Gly Gly Glu Asp Glu Thr Val Ile Gly Trp Asp Met Ala Ile His Ala
 580 585 590
 50
 Val Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Leu Ala
 595 600 605
 Ile Asp Glu Glu Ala Val Ala Lys Glu Gln Ser Ile Ser Thr Lys Pro
 610 615 620
 55
 Pro Tyr Lys Glu Arg Lys Asp Glu Leu Lys
 625 630

55 <210> 2
 <211> 1905
 <212> ADN
 <213> Vibrio cholerae – secuencia de ácidos nucleicos que codifica toxina de Cholix madura

60 <400> 2
 atgggtcgaag aagctttaa catctttgat gaatgccggtt cgccatgttc gttgaccccc 60
 gaaccgggta agccgattca atcaaaaactg tctatcccta gtgatgttgt tctggatgaa 120
 65

ES 2 900 328 T3

5 ggtgttctgt attactcgat gacgattaat gatgagcaga atgatattaa ggatgaggac 180
aaaggcgagt ccattatcac tattggtgaa tttgccacag tacgcgcgac tagacattat 240
10 gttaatcaag atgcgccttt tgggtgcatc cattedagata ttacgacaga aaatggtaca 300
aaaacgtact cttataaccg caaagagggt gaatttgcaa tcaattgggt agtgcctatt 360
15 ggtgaagatt ctctgcaag catcaaaatc tccgttgatg agctcgatca gcaacgcaat 420
atcatcgagg tgcctaaact gtatagtatt gatctogata accaaacggt agagcagtgg 480
aaaacccaag gtaatgtttc ttttctgta acgcgtcctg aacataatat cgctatctct 540
20 tggccaagcg tgagttacaa agcagcgcag aaagagggtt cacgccataa gcgttgggct 600
cattggcata caggcttagc actgtgttg cttgtgcaa tggatgctat ctataactat 660
25 atcaccocagc aaaattgtac tttaggggat aattggtttg gtggctctta tgagactggt 720
gcaggcactc cgaaggtgat tacggttaag caagggttg aacaaaagcc agttgagcag 780
cgcatccatt tctccaaggg gaatgcgatg agcgcacttg ctgctcatcg cgtctgtggt 840
30 gtgccattag aaactttggc gcgcagtcgc aaacctcgtg atctgacgga tgatttatca 900
tgtgcctatc aagcgcagaa tatcgtgagt ttatgtgctg cgacgcgat cctgttctct 960
35 catctggata gcgtatttac tctgaatcct gacgaacaag aaccagaggt ggctgaacgt 1020
ctaagtgatc ttcgccgat caatgaaaat aaccggggca tggttacaca ggttttaacc 1080
gttgctcgtc agatctataa cgattatgtc actcaccatc cgggcttaac tcctgagcaa 1140
40 accagtgcgg gtgcacaagc tgccgatatc ctctctttat tttgccaga tgctgataag 1200
tctgtgtgg cttcaaaca cgatcaagcc aatatcaaca tcgagtctcg ttctggccgt 1260
45 tcatatttgc ctgaaaaccg tgcggtaatc acccctcaag gcgtcacaaa ttggacttac 1320
caggaactcg aagcaacaca tcaagctctg actcgtgagg gttatgtgtt cgtgggttac 1380
catggtacga atcatgtcgc tgcgcaaacc atcgtgaatc gcattgcccc tgttccgcgc 1440
50 ggcaacaaca ctgaaaacga ggaaaagtgg ggcgggttat atggtgcaac tcacgctgaa 1500
gttgcccatg gttatgctcg catcaaagaa gggacagggg agtatggcct tccgaccctg 1560
55 gctgagcgcg acgctcgtgg ggtaatgctg cgcgtgtata tccctcgtgc ttcattagaa 1620
cgtttttata gcacgaatac acctttggaa aatgctgagg agcatatcac gcaagtgatt 1680
60 ggtcattctt tgccattacg caatgaagca tttactggtc cagaaagtgc gggcggggaa 1740
gacgaaactg tcattggctg ggatatggcg attcatgcag ttgcgatccc ttcgactatc 1800
ccagggaacg cttacgaaga attggcgatt gatgaggagg ctggtgcaaa agagcaatcg 1860
65 attagcacia aaccaccta taaagagcgc aaagatgaac ttaag 1905

ES 2 900 328 T3

<210> 3

<211> 386

<212> PRT

5 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-386

<400> 3

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

ES 2 900 328 T3

Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 50 55 60
 5
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 10
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 15
 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
 25
 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
 40
 Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190
 45
 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 50
 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 55
 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 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
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

ES 2 900 328 T3

5 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

10 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

15 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

20 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

25 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380

30 Gln
385

<210> 5
<211> 384
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-384

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

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

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

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

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

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

65 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

ES 2 900 328 T3

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
 10
 Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175
 15
 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
 25
 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
 35
 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
 50
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 55
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 60
 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
 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

ES 2 900 328 T3

<210> 6
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-383

5

<400> 6

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

ES 2 900 328 T3

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

5

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

10

Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

15

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

20

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

25

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

30

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

35

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

40

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
 370 375 380

45

<210> 7
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-382

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 900 328 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
 10
 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 15
 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 20
 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 25
 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
 35
 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
 50
 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 55
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 60
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 65
 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
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 65

ES 2 900 328 T3

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 5
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 10
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 15
 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala
 370 375 380
 <210> 8
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-381
 <400> 8
 25
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 30
 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 35
 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 40
 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
 55
 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 60
 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 65
 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 70
 Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
 145 150 155 160
 75

ES 2 900 328 T3

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

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

25 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
260 265 270

30 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285

35 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

40 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

45 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

50 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

55 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser
370 375 380

60 <210> 9
<211> 380
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-380

65 <400> 9

ES 2 900 328 T3

					245					250					255	
5	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
10	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275						280					285		
15	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
		290					295					300				
20	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
25	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
					325					330					335	
30	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly
				340					345					350		
35	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr
			355					360					365			
40	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr				
	370						375					380				
	<210> 10															
	<211> 379															
	<212> PRT															
	<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-379															
	<400> 10															
45	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
50	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
55	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
			35					40					45			
60	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
		50					55					60				
65	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val
	65					70					75					80
70	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu

ES 2 900 328 T3

				85					90					95		
5	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				
20	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys
	145					150					155					160
25	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile
				165						170					175	
30	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
				180					185					190		
35	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				
45	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		
60	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
65	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
		290					295					300				
70	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
75	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
				325						330					335	

ES 2 900 328 T3

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

5

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

10

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln
 370 375

<210> 11
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-378

15

<400> 11

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

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

ES 2 900 328 T3

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

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

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

15 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

30 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

35 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

40 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

45 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

50 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

55 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

60 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu
 370 375

<210> 12
 <211> 377
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-377

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

ES 2 900 328 T3

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
 20 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
 25 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 30 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 35 Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
 145 150 155 160
 40 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
 45 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 50 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 55 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
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 65

ES 2 900 328 T3

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

5

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

10

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

15

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

20

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

25

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

30

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro
 370 375

<210> 13
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-376

35

<400> 13

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 900 328 T3

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 5
 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
 15
 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
 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
 40
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 45
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 50
 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
 60
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 65
 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
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

ES 2 900 328 T3

5
 <210> 14
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-375

10
 <400> 14

15
 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr
 1 370 375

20
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15

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

30
 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45

35
 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60

40
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80

45
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95

50
 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
 Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
 145 150 155 160

70
 Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175

75
 Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190

80
 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205

85

ES 2 900 328 T3

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

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

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

20 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270

25 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

40 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

45 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

50 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

55 Val Thr His His Pro Gly Leu
370 375

<210> 15

<211> 374

<212> PRT

50 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-374

<400> 15

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

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

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

ES 2 900 328 T3

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 5
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 10
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 15
 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
 25
 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
 40
 Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190
 45
 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 50
 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 55
 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 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
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala

ES 2 900 328 T3

	290		295		300														
5	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His			
	305					310					315					320			
10	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val			
					325					330					335				
15	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly			
				340					345					350					
20	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr			
			355					360					365						
25	Val	Thr	His	His	Pro	Gly													
	370																		
	<210>	16																	
	<211>	373																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-373																	
30	<400>	16																	
	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser			
	1				5					10					15				
35	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						
45	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile			
	50						55					60							
50	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val			
	65					70					75					80			
55	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu			
				85						90					95				
60	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala			
				100					105					110					
65	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys			
			115					120					125						
65	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro			

ES 2 900 328 T3

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

<210> 17
<211> 372

ES 2 900 328 T3

<212> PRT

<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-372

<400> 17

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

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

15 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

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

25 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

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

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

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

65

ES 2 900 328 T3

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

5

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

10

Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

15

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

20

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

25

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

30

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

35

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

40

Val Thr His His
 370

45

<210> 18
 <211> 371
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-371

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 15 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 20 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
 25 Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175
 30 Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190
 35 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
 50 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 55 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
 60 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 65

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 15 Val Thr His
 370
 <210> 19
 <211> 370
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-370
 <400> 19
 25 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 30 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 35 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 40 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
 55 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 60 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 65 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

ES 2 900 328 T3

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

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

25 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
260 265 270

30 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285

35 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

40 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

45 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

50 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

55 Val Thr
370

60 <210> 20
<211> 369
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-369

65 <400> 20

ES 2 900 328 T3

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

ES 2 900 328 T3

5 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
260 265 270

10 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285

15 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

20 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

25 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

30 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

35 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

40 Val

35 <210> 21
<211> 368
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-368

40 <400> 21

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

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

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

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

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

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

ES 2 900 328 T3

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
 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
 30 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 35 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 40 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
 260 265 270
 50 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
 60 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 65 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

ES 2 900 328 T3

		195		200		205													
5	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn			
		210					215					220							
10	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala			
	225					230					235					240			
15	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro			
				245						250					255				
20	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu			
				260					265					270					
25	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			
40	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val			
				325						330					335				
45	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly			
				340					345					350					
50	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp				
			355					360					365						
55	<210>	23																	
	<211>	366																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-366																	
60	<400>	23																	
65	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser			
	1				5					10					15				
70	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro			
			20						25					30					
75	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile			
			35				40						45						
80	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile			

ES 2 900 328 T3

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

ES 2 900 328 T3

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
 355 360 365
 <210> 24
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-365
 <400> 24
 25 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 30 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 35 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 40 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
 55 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 60 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 65 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

ES 2 900 328 T3

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

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

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

30 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

35 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

40 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

45 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

50 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr
355 360 365

55 <210> 25
<211> 364
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-364

60 <400> 25

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

ES 2 900 328 T3

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
 20 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 25 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 30 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 35 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
 60 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
 65 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

ES 2 900 328 T3

5 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285

10 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

15 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

20 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

25 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

30 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile
355 360

<210> 26
<211> 363
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-363

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

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

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

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

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

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

65 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

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175
 15 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
 25 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
 35 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
 55 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 60 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln
 355 360

<210> 27
 <211> 362
 <212> PRT

ES 2 900 328 T3

<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-362

<400> 27

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

ES 2 900 328 T3

Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 5
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 10
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 15
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 20
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 25
 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 30
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 35
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg
 355 360
 <210> 28
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-361
 <400> 28
 40
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 45
 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 50
 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 55
 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 60
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 65
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95

ES 2 900 328 T3

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
 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
 30 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 35 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 40 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
 260 265 270
 50 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
 60 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 65 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

ES 2 900 328 T3

		195		200		205													
5	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn			
		210					215					220							
10	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala			
	225					230					235					240			
15	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro			
					245					250					255				
20	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu			
				260					265					270					
25	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			
40	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val			
					325					330					335				
45	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly			
				340					345					350					
50	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val											
				355				360											
55	<210>	30																	
	<211>	359																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-359																	
60	<400>	30																	
	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser			
	1				5					10					15				
65	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro			
				20					25					30					
70	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile			
			35					40					45						
75	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile			

ES 2 900 328 T3

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

ES 2 900 328 T3

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 5
 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
 355
 <210> 31
 <211> 358
 <212> PRT
 20 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-358
 <400> 31
 25 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 30 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 35 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 40 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
 55 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 60 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 65 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 70 Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
 145 150 155 160

ES 2 900 328 T3

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175
 5
 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
 20
 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 25
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 30
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 35
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 40
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 45
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 50
 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
 55
 Met Val Thr Gln Val Leu
 355
 60
 <210> 32
 <211> 357
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-357
 65
 <400> 32
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15

ES 2 900 328 T3

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
 20 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 25 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 30 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 35 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
 60 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
 65 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

ES 2 900 328 T3

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

5

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

10

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

15

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

20

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

25

Met Val Thr Gln Val
 355

<210> 33
 <211> 356
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-356

30

<400> 33

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

35

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175
 15 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
 25 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
 35 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
 55 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 60 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 Met Val Thr Gln
 355

<210> 34
 <211> 355
 <212> PRT

ES 2 900 328 T3

<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-355

<400> 34

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

ES 2 900 328 T3

Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 5
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 10
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 15
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 20
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 25
 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 30
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 35
 Met Val Thr
 355
 35
 <210> 35
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-354
 40
 <400> 35
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 45
 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 50
 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 55
 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 60
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 65
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95

ES 2 900 328 T3

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
 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
 30 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
 35 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 40 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 45 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 50 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
 55 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 60 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

ES 2 900 328 T3

	195	200	205														
5	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn	
	210						215					220					
10	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala	
	225					230					235					240	
15	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro	
					245					250					255		
20	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu	
				260					265					270			
25	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	
40	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	
					325					330					335		
45	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly	
				340					345					350			
50	Met																
55	<210> 37																
	<211> 352																
	<212> PRT																
	<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-352																
60	<400> 37																
65	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser	
	1				5					10					15		
70	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro	
				20					25					30			
75	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile	
			35					40					45				
80	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile	

ES 2 900 328 T3

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

ES 2 900 328 T3

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 <210> 38
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-351
 20 <400> 38
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 25 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 30 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 35 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 40 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 45 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 50 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 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

ES 2 900 328 T3

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

5

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

10

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

15

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

30

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

35

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

40

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

45

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

50

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro
 340 345 350

<210> 39

<211> 350

<212> PRT

50 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-350

<400> 39

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

55

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

60

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

65

ES 2 900 328 T3

	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
	50						55					60				
5	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val
	65					70					75					80
10	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu
					85					90					95	
15	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			
25	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	
40	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
				180					185					190		
45	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
			195					200					205			
50	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
	210						215					220				
55	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	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
70	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
75	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
	290						295					300				

ES 2 900 328 T3

5 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

10 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

15 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn
340 345 350

15 <210> 40
<211> 349
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-349

20 <400> 40

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

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

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

40 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

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

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

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

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

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

ES 2 900 328 T3

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

5

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

10

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

15

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

30

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

35

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

40

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

45

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
 340 345

<210> 41
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-348

<400> 41

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

55

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

60

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

65

ES 2 900 328 T3

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 5
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 10
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 15
 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
 25
 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
 40
 Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190
 45
 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 50
 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 55
 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 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
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

ES 2 900 328 T3

5 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

10 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

15 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu
340 345

15 <210> 42
<211> 425
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-425

20 <400> 42

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

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

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

40 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

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

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

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

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

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

ES 2 900 328 T3

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

5

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

10

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

15

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

30

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

35

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

40

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

45

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

50

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

55

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

60

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380

65

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

Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn

ES 2 900 328 T3

420

425

5 <210> 43
 <211> 424
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de Vibreo cholerae 1-424

10 <400> 43

Val Glu Asp Glu 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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

75 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn

ES 2 900 328 T3

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

<210> 44

60 <211> 423

<212> PRT

<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-423

<400> 44

65

ES 2 900 328 T3

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

ES 2 900 328 T3

Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 5
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 10
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 15
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 20
 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 25
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 30
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 35
 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 40
 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400
 45
 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
 420
 50
 <210> 45
 <211> 422
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-422
 <400> 45
 55
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 60
 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 65
 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45

ES 2 900 328 T3

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 5
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 10
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 15
 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
 25
 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
 40
 Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190
 45
 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 50
 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 55
 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 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
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

ES 2 900 328 T3

5 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

10 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

15 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

20 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

25 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380

30 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
385 390 395 400

35 Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
405 410 415

40 Ser Gly Arg Ser Tyr Leu
420

35 <210> 46
<211> 421
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-421

40 <400> 46

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

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

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

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

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

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

ES 2 900 328 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
 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
 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
 30
 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 35
 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 40
 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
 50
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 55
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 60
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 65
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 60
 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 2 900 328 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

10

Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400

15

Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
 405 410 415

20

Ser Gly Arg Ser Tyr
 420

<210> 47
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-420

25

<400> 47

30

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

35

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 900 328 T3

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
 15 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 20 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 25 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
 30 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 35 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 40 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 45 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
 50 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 55 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 60 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 65 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser

ES 2 900 328 T3

				180					185				190			
5	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
			195					200					205			
10	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
		210					215					220				
15	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		
30	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
35	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
		290					295					300				
40	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
45	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
				325						330					335	
50	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly
				340					345					350		
55	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr
		355						360					365			
60	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala
		370					375					380				
65	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Cys	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Ser
	385					390					395					400
70	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Asn	Asp	Gln	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ser	Arg
				405						410					415	
75	Ser	Gly	Arg													

65 <210> 49

ES 2 900 328 T3

<211> 418
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-418

5 <400> 49

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

ES 2 900 328 T3

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

5

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

10

Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

15

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

20

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

25

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

30

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

35

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

40

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

45

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

55

Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
 405 410 415

60

Ser Gly
 <210> 50
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-417
 <400> 50

65

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

ES 2 900 328 T3

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
 20 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 25 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 30 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 35 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
 60 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
 65 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

ES 2 900 328 T3

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

5 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

10 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

15 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

20 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

25 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

30 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380

35 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400

40 Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
 405 410 415

40 Ser

<210> 51
 <211> 416
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-416

45 <400> 51

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

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

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

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

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 15 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 20 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 25 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
 35 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
 50 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
 55 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 60 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 65 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
 305 310 315 320

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 15 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 20 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400
 25 Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
 405 410 415
 30 <210> 52
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-415
 <400> 52
 35 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 40 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 45 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 50 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 55 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 60 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 65 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

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175
 15 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
 25 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
 30 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 Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 40 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 45 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
 65 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala

ES 2 900 328 T3

	370		375		380														
5	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Cys	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Ser			
	385					390					395					400			
10	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Asn	Asp	Gln	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu	Ser				
					405					410					415				
15	<210> 53 <211> 414 <212> PRT <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-414 <400> 53																		
20	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser			
	1				5					10					15				
25	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro			
				20					25					30					
30	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile			
			35					40					45						
35	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile			
		50					55					60							
40	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val			
	65					70					75					80			
45	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu			
					85					90					95				
50	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	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys			
	145					150					155					160			
70	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile			
				165						170					175				
75	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly			

ES 2 900 328 T3

				180					185					190			
5	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys	
			195					200					205				
10	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn	
		210					215					220					
15	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			
30	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser	
			275					280					285				
35	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala	
		290					295					300					
40	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His	
	305					310					315					320	
45	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val	
				325						330					335		
50	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly	
				340					345					350			
55	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr	
		355						360					365				
60	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala	
		370					375					380					
65	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Cys	Pro	Asp	Ala	Asp	Lys	Ser	
	385					390					395					400	
70	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Asn	Asp	Gln	Ala	Asn	Ile	Asn	Ile	Glu			
				405						410							

<210> 54

<211> 413

<212> PRT

65 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-413

ES 2 900 328 T3

<400> 54

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

ES 2 900 328 T3

Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 5
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 10
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 15
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 20
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 25
 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 30
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 35
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 40
 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 45
 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
 405 410

<210> 55

<211> 412

<212> PRT

50 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-412

<400> 55

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

ES 2 900 328 T3

Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 5
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 10
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 15
 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
 25
 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
 40
 Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190
 45
 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 50
 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 55
 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 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
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

ES 2 900 328 T3

5 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

10 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

15 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

20 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

25 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380

30 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
405 410

35 <210> 56
<211> 411
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-411

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

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

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

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

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

65 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

ES 2 900 328 T3

Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 5
 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
 15
 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
 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
 40
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 45
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 50
 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
 60
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 65
 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
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

ES 2 900 328 T3

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 5
 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400
 10
 Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile
 405 410
 15
 <210> 57
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-410
 20
 <400> 57
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 25
 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 30
 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 35
 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 40
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 45
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 50
 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
 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

ES 2 900 328 T3

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

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

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

15 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

40 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

45 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

50 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380

55 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400

60 Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn
 405 410

<210> 58
 <211> 409
 <212> PRT

65

ES 2 900 328 T3

<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-409

<400> 58

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

ES 2 900 328 T3

	225				230					235					240	
5	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro
					245					250					255	
10	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
15	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
20	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
		290					295					300				
25	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
30	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
					325					330					335	
35	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly
				340					345					350		
40	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr
			355					360					365			
45	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
55	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Asn	Asp	Gln	Ala							
					405											
60	<210>	59														
	<211>	408														
	<212>	PRT														
	<213>	Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-408														
65	<400>	59														
	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
70	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
75	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile

ES 2 900 328 T3

5	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			
15	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						
30	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro			
	130						135					140							
35	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys			
	145					150					155					160			
40	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile			
				165						170					175				
45	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							
60	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala			
	225					230					235					240			
65	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro			
				245						250					255				
70	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu			
			260						265					270					
75	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser			
			275				280						285						

ES 2 900 328 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
 10
 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 15
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 20
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 25
 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 30
 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400
 35
 Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln
 405
 <210> 60
 <211> 407
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-407
 <400> 60
 40
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 45
 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 50
 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 55
 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 60
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 65
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95

ES 2 900 328 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			
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
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		
30	Ser	Arg	His	Lys	Arg	Trp	Ala	His	Trp	His	Thr	Gly	Leu	Ala	Leu	Cys
			195					200					205			
35	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn
		210					215					220				
40	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	
50	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
55	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
60	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
		290					295					300				
65	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
70	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
					325					330					335	
75	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly
				340					345					350		

ES 2 900 328 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

10

Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400

15

Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp
 405

<210> 61
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-406

<400> 61

25

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

30

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

35

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

40

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 900 328 T3

Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175
 5
 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
 20
 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 25
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 30
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 35
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 40
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 45
 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
 50
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 55
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 60
 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400
 65
 Cys Val Ala Ser Asn Asn
 405

ES 2 900 328 T3

<210> 62

<211> 405

<212> PRT

5 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-405

<400> 62

10	Val	Glu	Asp	Glu	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	
20	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile	35	40	45	
25	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile	50	55	60	
30	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val	65	70	75	80
35	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu	85	90	95	
40	Asn	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Asn	Arg	Lys	Glu	Gly	Glu	Phe	Ala	100	105	110	
45	Ile	Asn	Trp	Leu	Val	Pro	Ile	Gly	Glu	Asp	Ser	Pro	Ala	Ser	Ile	Lys	115	120	125	
50	Ile	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Asp	Gln	Gln	Arg	Asn	Ile	Ile	Glu	Val	Pro	130	135	140	
55	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys	145	150	155	160
60	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile	165	170	175	
65	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	
	Trp	Leu	Val	Pro	Met	Asp	Ala	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Thr	Gln	Gln	Asn	210	215	220	

ES 2 900 328 T3

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

5

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

10

Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

15

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

20

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

25

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

30

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

35

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

40

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

45

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380

Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400

50

Cys Val Ala Ser Asn
 405

<210> 63
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-404

55

<400> 63

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

60

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

65

ES 2 900 328 T3

Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 5
 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
 15
 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
 30
 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 35
 Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
 145 150 155 160
 40
 Thr Gln Gly Asn Val Ser Phe Ser Val Thr Arg Pro Glu His Asn Ile
 165 170 175
 45
 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
 60
 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 65
 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
 260 265 270
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser

ES 2 900 328 T3

				85					90				95			
5	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				
20	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ile	Asp	Leu	Asp	Asn	Gln	Thr	Leu	Glu	Gln	Trp	Lys
	145					150					155					160
25	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Arg	Pro	Glu	His	Asn	Ile
				165						170					175	
30	Ala	Ile	Ser	Trp	Pro	Ser	Val	Ser	Tyr	Lys	Ala	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly
				180					185					190		
35	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				
45	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		
60	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275				280						285			
65	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
		290					295					300				
70	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
75	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
				325						330					335	

ES 2 900 328 T3

5 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

10 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

15 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380

20 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
385 390 395 400

25 Cys Val Ala

<210> 65
<211> 402
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-402

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

35 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

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

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

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

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

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

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

ES 2 900 328 T3

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
 15 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 20 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 25 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
 30 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 35 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 40 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 45 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
 50 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 55 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 60 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 65 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400

ES 2 900 328 T3

Cys Val

5 <210> 66
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-401

10 <400> 66

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

ES 2 900 328 T3

Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 5
 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 10
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 15
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 20
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 25
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 30
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 35
 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
 50
 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 55
 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400
 60
 Cys
 <210> 67
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-400
 <400> 67
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 65

ES 2 900 328 T3

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
 20 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 25 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 30 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 35 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
 60 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
 65 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

ES 2 900 328 T3

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

5

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

10

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

15

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

20

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

25

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

30

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380

35

Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400

<210> 68
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-399

40

<400> 68

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 900 328 T3

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
 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
 30 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
 35 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 40 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 45 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 50 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
 55 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 60 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

ES 2 900 328 T3

					165					170					175	
5	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				
20	Cys	Thr	Leu	Gly	Asp	Asn	Trp	Phe	Gly	Gly	Ser	Tyr	Glu	Thr	Val	Ala
	225					230					235					240
25	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro
					245					250					255	
30	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
35	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
40	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
		290					295					300				
45	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
50	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			
65	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala
		370					375					380				
70	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Cys	Pro	Asp	Ala	Asp		
	385					390					395					

<210> 70

<211> 397

<212> PRT

65 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-397

ES 2 900 328 T3

<400> 70

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

ES 2 900 328 T3

5 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
260 265 270

10 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
275 280 285

15 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
290 295 300

20 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
305 310 315 320

25 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
325 330 335

30 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
340 345 350

35 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
355 360 365

40 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
370 375 380

45 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala
385 390 395

<210> 71
<211> 396
<212> PRT
<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-396

50 <400> 71
Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
1 5 10 15

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

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

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

ES 2 900 328 T3

5
 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
 10
 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 15
 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 20
 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 25
 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
 35
 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
 50
 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 55
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 60
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 65
 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
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 15 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 20 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp
 385 390 395
 <210> 72
 <211> 395
 <212> PRT
 25 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-395
 <400> 72
 30 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 35 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
 45 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 50 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 55 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 60 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 65 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 70 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 75

ES 2 900 328 T3

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
 15 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 20 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 25 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
 30 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 35 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 40 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 45 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
 50 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 55 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 60 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 65 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro
 385 390 395

ES 2 900 328 T3

<210> 73

<211> 394

<212> PRT

5 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-394

<400> 73

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

ES 2 900 328 T3

Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 5
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 10
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 15
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 20
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 25
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 30
 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 35
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 40
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 45
 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
 385 390

<210> 74

<211> 393

<212> PRT

50 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-393

<400> 74

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

ES 2 900 328 T3

5 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
 65 70 75 80
 10 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 15 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
 25 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
 40 Ala Ile Ser Trp Pro Ser Val Ser Tyr Lys Ala Ala Gln Lys Glu Gly
 180 185 190
 45 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 50 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 55 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 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
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala

ES 2 900 328 T3

	290		295		300														
5	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His			
	305					310					315					320			
10	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val			
					325					330					335				
15	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly			
				340					345					350					
20	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr			
			355					360					365						
25	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala			
		370					375					380							
30	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe										
	385					390													
	<210> 75																		
	<211> 392																		
	<212> PRT																		
	<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-392																		
35	<400> 75																		
	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser			
	1				5					10					15				
40	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro			
				20					25					30					
45	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile			
			35					40					45						
50	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile			
	50						55					60							
55	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val			
	65					70					75				80				
60	Asn	Gln	Asp	Ala	Pro	Phe	Gly	Val	Ile	His	Leu	Asp	Ile	Thr	Thr	Glu			
				85						90				95					
65	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			

ES 2 900 328 T3

5	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			
15	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						
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			
40	Gly	Thr	Pro	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Gln	Gly	Ile	Glu	Gln	Lys	Pro			
					245					250					255				
45	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu			
				260					265					270					
50	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							
60	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His			
	305					310					315					320			
65	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val			
					325					330					335				
70	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly			
				340					345					350					
75	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr			
			355					360					365						

ES 2 900 328 T3

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 5
 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu
 385 390
 10 <210> 76
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-391
 15 <400> 76
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 20 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 25 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 30 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 35 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 40 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 45 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 50 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 55 Ile Ser Val Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val Pro
 130 135 140
 60 Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp Lys
 145 150 155 160
 65 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

ES 2 900 328 T3

Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 5
 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 10
 Cys Thr Leu Gly Asp Asn Trp Phe Gly Gly Ser Tyr Glu Thr Val Ala
 225 230 235 240
 15
 Gly Thr Pro Lys Val Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys Pro
 245 250 255
 20
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 25
 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
 40
 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335
 45
 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350
 50
 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 55
 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 60
 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser
 385 390
 65
 <210> 77
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-390
 <400> 77
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15

ES 2 900 328 T3

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
 20 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 25 Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Tyr Asn Arg Lys Glu Gly Glu Phe Ala
 100 105 110
 30 Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile Lys
 115 120 125
 35 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
 60 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
 65 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270

ES 2 900 328 T3

Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

5

Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

10

Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

15

Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

20

Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

25

Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

30

Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380

35

Gln Ala Ala Asp Ile Leu
 385 390

<210> 78
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-389

40

<400> 78

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 900 328 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
 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
 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
 30
 Ser Arg His Lys Arg Trp Ala His Trp His Thr Gly Leu Ala Leu Cys
 195 200 205
 35
 Trp Leu Val Pro Met Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln Asn
 210 215 220
 40
 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
 50
 Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Gly Asn Ala Met Ser Ala Leu
 260 265 270
 55
 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285
 60
 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300
 65
 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320
 60
 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 2 900 328 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
 10
 Gln Ala Ala Asp Ile
 385
 <210> 79
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-388
 <400> 79
 20
 Val Glu Asp Glu Leu Asn Ile Phe Asp Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ser
 1 5 10 15
 25
 Leu Thr Pro Glu Pro Gly Lys Pro Ile Gln Ser Lys Leu Ser Ile Pro
 20 25 30
 30
 Ser Asp Val Val Leu Asp Glu Gly Val Leu Tyr Tyr Ser Met Thr Ile
 35 40 45
 35
 Asn Asp Glu Gln Asn Asp Ile Lys Asp Glu Asp Lys Gly Glu Ser Ile
 50 55 60
 40
 Ile Thr Ile Gly Glu Phe Ala Thr Val Arg Ala Thr Arg His Tyr Val
 65 70 75 80
 45
 Asn Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile His Leu Asp Ile Thr Thr Glu
 85 90 95
 50
 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
 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

ES 2 900 328 T3

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

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

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

15 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

30 Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg Ser
 275 280 285

35 Arg Lys Pro Arg Asp Leu Thr Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Gln Ala
 290 295 300

40 Gln Asn Ile Val Ser Leu Phe Val Ala Thr Arg Ile Leu Phe Ser His
 305 310 315 320

45 Leu Asp Ser Val Phe Thr Leu Asn Leu Asp Glu Gln Glu Pro Glu Val
 325 330 335

50 Ala Glu Arg Leu Ser Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro Gly
 340 345 350

55 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365

60 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380

65 Gln Ala Ala Asp
 385

<210> 80

60 <211> 387

<212> PRT

<213> Residuos de aminoácidos de toxina de Cholix de vibreo cholerae 1-387

<400> 80

65

ES 2 900 328 T3

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

ES 2 900 328 T3

					245					250					255	
5	Val	Glu	Gln	Arg	Ile	His	Phe	Ser	Lys	Gly	Asn	Ala	Met	Ser	Ala	Leu
				260					265					270		
10	Ala	Ala	His	Arg	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Ser
			275					280					285			
15	Arg	Lys	Pro	Arg	Asp	Leu	Thr	Asp	Asp	Leu	Ser	Cys	Ala	Tyr	Gln	Ala
		290					295					300				
20	Gln	Asn	Ile	Val	Ser	Leu	Phe	Val	Ala	Thr	Arg	Ile	Leu	Phe	Ser	His
	305					310					315					320
25	Leu	Asp	Ser	Val	Phe	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Val
					325					330					335	
30	Ala	Glu	Arg	Leu	Ser	Asp	Leu	Arg	Arg	Ile	Asn	Glu	Asn	Asn	Pro	Gly
				340					345					350		
35	Met	Val	Thr	Gln	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Arg	Gln	Ile	Tyr	Asn	Asp	Tyr
			355					360					365			
40	Val	Thr	His	His	Pro	Gly	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Thr	Ser	Ala	Gly	Ala
	370						375					380				
45	Gln	Ala	Ala													
	385															
50	<210> 81															
	<211> 633															
	<212> PRT															
55	<213> Toxina de Cholix madura de Vibreo cholerae eliminada en residuo de aminoácidos 581															
60	<400> 81															
65	Val	Glu	Asp	Glu	Leu	Asn	Ile	Phe	Asp	Glu	Cys	Arg	Ser	Pro	Cys	Ser
	1				5					10					15	
70	Leu	Thr	Pro	Glu	Pro	Gly	Lys	Pro	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Ser	Ile	Pro
				20					25					30		
75	Ser	Asp	Val	Val	Leu	Asp	Glu	Gly	Val	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Thr	Ile
			35					40					45			
80	Asn	Asp	Glu	Gln	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Glu	Asp	Lys	Gly	Glu	Ser	Ile
		50					55					60				
85	Ile	Thr	Ile	Gly	Glu	Phe	Ala	Thr	Val	Arg	Ala	Thr	Arg	His	Tyr	Val

ES 2 900 328 T3

5 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
 10 Met Val Thr Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp Tyr
 355 360 365
 15 Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly Ala
 370 375 380
 20 Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys Ser
 385 390 395 400
 25 Cys Val Ala Ser Asn Asn Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser Arg
 405 410 415
 30 Ser Gly Arg Ser Tyr Leu Pro Glu Asn Arg Ala Val Ile Thr Pro Gln
 420 425 430
 35 Gly Val Thr Asn Trp Thr Tyr Gln Glu Leu Glu Ala Thr His Gln Ala
 435 440 445
 40 Leu Thr Arg Glu Gly Tyr Val Phe Val Gly Tyr His Gly Thr Asn His
 450 455 460
 45 Val Ala Ala Gln Thr Ile Val Asn Arg Ile Ala Pro Val Pro Arg Gly
 465 470 475 480
 50 Asn Asn Thr Glu Asn Glu Glu Lys Trp Gly Gly Leu Tyr Val Ala Thr
 485 490 495
 55 His Ala Glu Val Ala His Gly Tyr Ala Arg Ile Lys Glu Gly Thr Gly
 500 505 510
 60 Glu Tyr Gly Leu Pro Thr Arg Ala Glu Arg Asp Ala Arg Gly Val Met
 515 520 525
 65 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
 His Ser Leu Pro Leu Arg Asn Glu Ala Phe Thr Gly Pro Glu Ser Ala
 565 570 575

ES 2 900 328 T3

Gly Gly Glu Asp Thr Val Ile Gly Trp Asp Met Ala Ile His Ala Val
 580 585 590
 5
 Ala Ile Pro Ser Thr Ile Pro Gly Asn Ala Tyr Glu Glu Leu Ala Ile
 595 600 605
 10
 Asp Glu Glu Ala Val Ala Lys Glu Gln Ser Ile Ser Thr Lys Pro Pro
 610 615 620
 15
 Tyr Lys Glu Arg Lys Asp Glu Leu Lys
 625 630
 <210> 82
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens - Interleucina-10
 <400> 82
 25
 Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
 1 5 10 15
 30
 Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
 20 25 30
 35
 Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
 35 40 45
 40
 Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
 50 55 60
 45
 Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
 65 70 75 80
 50
 Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
 85 90 95
 55
 Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
 100 105 110
 60
 Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
 115 120 125
 65
 Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
 130 135 140
 70
 Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
 145 150 155 160
 75

ES 2 900 328 T3

Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
 165 170 175
 5
 Arg Asn
 <210> 83
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens - Interleucina-19
 <400> 83
 15
 Met Lys Leu Gln Cys Val Ser Leu Trp Leu Leu Gly Thr Ile Leu Ile
 1 5 10 15
 20
 Leu Cys Ser Val Asp Asn His Gly Leu Arg Arg Cys Leu Ile Ser Thr
 20 25 30
 25
 Asp Met His His Ile Glu Glu Ser Phe Gln Glu Ile Lys Arg Ala Ile
 35 40 45
 30
 Gln Ala Lys Asp Thr Phe Pro Asn Val Thr Ile Leu Ser Thr Leu Glu
 50 55 60
 35
 Thr Leu Gln Ile Ile Lys Pro Leu Asp Val Cys Cys Val Thr Lys Asn
 65 70 75 80
 40
 Leu Leu Ala Phe Tyr Val Asp Arg Val Phe Lys Asp His Gln Glu Pro
 85 90 95
 45
 Asn Pro Lys Ile Leu Arg Lys Ile Ser Ser Ile Ala Asn Ser Phe Leu
 100 105 110
 50
 Tyr Met Gln Lys Thr Leu Arg Gln Cys Gln Glu Gln Arg Gln Cys His
 115 120 125
 55
 Cys Arg Gln Glu Ala Thr Asn Ala Thr Arg Val Ile His Asp Asn Tyr
 130 135 140
 60
 Asp Gln Leu Glu Val His Ala Ala Ala Ile Lys Ser Leu Gly Glu Leu
 145 150 155 160
 65
 Asp Val Phe Leu Ala Trp Ile Asn Lys Asn His Glu Val Met Ser Ser
 165 170 175
 Ala
 <210> 84
 <211> 176
 <212> PRT

ES 2 900 328 T3

<213> Homo sapiens - Interleucina-20

<400> 84

5 Met Lys Ala Ser Ser Leu Ala Phe Ser Leu Leu Ser Ala Ala Phe Tyr
1 5 10 15

10 Leu Leu Trp Thr Pro Ser Thr Gly Leu Lys Thr Leu Asn Leu Gly Ser
20 25 30

15 Cys Val Ile Ala Thr Asn Leu Gln Glu Ile Arg Asn Gly Phe Ser Glu
35 40 45

20 Ile Arg Gly Ser Val Gln Ala Lys Asp Gly Asn Ile Asp Ile Arg Ile
50 55 60

25 Leu Arg Arg Thr Glu Ser Leu Gln Asp Thr Lys Pro Ala Asn Arg Cys
65 70 75 80

30 Cys Leu Leu Arg His Leu Leu Arg Leu Tyr Leu Asp Arg Val Phe Lys
85 90 95

35 Asn Tyr Gln Thr Pro Asp His Tyr Thr Leu Arg Lys Ile Ser Ser Leu
100 105 110

40 Ala Asn Ser Phe Leu Thr Ile Lys Lys Asp Leu Arg Leu Cys His Ala
115 120 125

45 His Met Thr Cys His Cys Gly Glu Glu Ala Met Lys Lys Tyr Ser Gln
130 135 140

50 Ile Leu Ser His Phe Glu Lys Leu Glu Pro Gln Ala Ala Val Val Lys
145 150 155 160

55 Ala Leu Gly Glu Leu Asp Ile Leu Leu Gln Trp Met Glu Glu Thr Glu
165 170 175

50 <210> 85
<211> 179
<212> PRT
<213> Homo sapiens - Interleucina-22

55 <400> 85

Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe Leu Met Gly Thr Leu
1 5 10 15

60

65

ES 2 900 328 T3

Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Leu Ala Leu Leu Val Gln Gly Gly Ala
 20 25 30

5

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

20

His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
 85 90 95

25

Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln Ser Asp Arg Phe Gln
 100 105 110

30

Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala Arg Leu Ser Asn Arg
 115 120 125

35

Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn
 130 135 140

40

Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
 145 150 155 160

45

Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
 165 170 175

Ala Cys Ile

45

<210> 86
 <211> 207
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens - Interleucina-24

50

<400> 86

Met Asn Phe Gln Gln Arg Leu Gln Ser Leu Trp Thr Leu Ala Ser Arg
 1 5 10 15

55

Pro Phe Cys Pro Pro Leu Leu Ala Thr Ala Ser Gln Met Gln Met Val
 20 25 30

60

Val Leu Pro Cys Leu Gly Phe Thr Leu Leu Leu Trp Ser Gln Val Ser
 35 40 45

65

ES 2 900 328 T3

5 Gly Ala Gln Gly Gln Glu Phe His Phe Gly Pro Cys Gln Val Lys Gly
 50 55 60
 Val Val Pro Gln Lys Leu Trp Glu Ala Phe Trp Ala Val Lys Asp Thr
 65 70 75 80
 10 Met Gln Ala Gln Asp Asn Ile Thr Ser Ala Arg Leu Leu Gln Gln Glu
 85 90 95
 15 Val Leu Gln Asn Val Ser Asp Ala Glu Ser Cys Tyr Leu Val His Thr
 100 105 110
 20 Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Lys Thr Val Phe Lys Asn Tyr His Asn Arg
 115 120 125
 25 Thr Val Glu Val Arg Thr Leu Lys Ser Phe Ser Thr Leu Ala Asn Asn
 130 135 140
 30 Phe Val Leu Ile Val Ser Gln Leu Gln Pro Ser Gln Glu Asn Glu Met
 145 150 155 160
 35 Phe Ser Ile Arg Asp Ser Ala His Arg Arg Phe Leu Leu Phe Arg Arg
 165 170 175
 40 Ala Phe Lys Gln Leu Asp Val Glu Ala Ala Leu Thr Lys Ala Leu Gly
 180 185 190
 45 Glu Val Asp Ile Leu Leu Thr Trp Met Gln Lys Phe Tyr Lys Leu
 195 200 205
 <210> 87
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens - Interleucina-26
 <400> 87
 50 Met Leu Val Asn Phe Ile Leu Arg Cys Gly Leu Leu Leu Val Thr Leu
 1 5 10
 55 Ser Leu Ala Ile Ala Lys His Lys Gln Ser Ser Phe Thr Lys Ser Cys
 20 25 30
 60 Tyr Pro Arg Gly Thr Leu Ser Gln Ala Val Asp Ala Leu Tyr Ile Lys
 35 40 45
 65 Ala Ala Trp Leu Lys Ala Thr Ile Pro Glu Asp Arg Ile Lys Asn Ile
 50 55 60

ES 2 900 328 T3

Arg Leu Leu Lys Lys Lys Thr Lys Lys Gln Phe Met Lys Asn Cys Gln
 65 70 75 80
 5
 Phe Gln Glu Gln Leu Leu Ser Phe Phe Met Glu Asp Val Phe Gly Gln
 85 90 95
 10
 Leu Gln Leu Gln Gly Cys Lys Lys Ile Arg Phe Val Glu Asp Phe His
 100 105 110
 15
 Ser Leu Arg Gln Lys Leu Ser His Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ser Ala
 115 120 125
 20
 Arg Glu Met Lys Ser Ile Thr Arg Met Lys Arg Ile Phe Tyr Arg Ile
 130 135 140
 25
 Gly Asn Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Ile Ser Glu Leu Asp Ile Leu Leu
 145 150 155 160
 30
 Ser Trp Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser Ser Gln
 165 170
 35
 <210> 88
 <211> 224
 <212> PRT
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> región variable de la cadena pesada para un anticuerpo anti-TNF-alfa
 <400> 88
 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 50
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 55
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 60
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 65
 Glu Arg Gly Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 70
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

ES 2 900 328 T3

5 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

10 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
115 120 125

15 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140

20 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

25 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

30 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

35 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

40 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

<210> 89
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> región variable de la cadena ligera para un anticuerpo anti-TNF-alfa

<400> 89

45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

50 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

55 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

60 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

65 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

ES 2 900 328 T3

5 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

 10 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

 15 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

 20 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

 25 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

 30 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

 35 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

 40 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

 45 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

 50 <210> 90
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> región variable de la cadena pesada para un anticuerpo anti-TNF-alfa

 55 <400> 90

 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 60 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ala Ile Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Ser Ser Ala Asp Ser Val
 50 55 60

ES 2 900 328 T3

5 Lys Gly Arg Phe Thr Tyr Ser Arg Arg Asn Ser Lys Asn Ala Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95
 10 Ala Arg Asp Arg Gly Val Ser Ala Gly Gly Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 15 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 91
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> región variable de la cadena ligera para un anticuerpo anti-TNF-alfa
 25 <400> 91
 30 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 35 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 40 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45 Ser Gly Ser Gly Thr Arg Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 50 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95
 55 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Leu
 100 105
 <210> 92
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de proteína de fusión dimérica TNFR-p75-Fc humana
 60 <400> 92
 65

ES 2 900 328 T3

				245					250					255			
5	Gly	Pro	Ser	Val 260	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 265	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 270	Leu	Met	
10	Ile	Ser	Arg 275	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 280	Cys	Val	Val	Val	Asp 285	Val	Ser	His	
15	Glu	Asp 290	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 295	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 300	Gly	Val	Glu	Val	
20	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 310	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 315	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 320	
25	Arg	Val	Val	Ser	Val 325	Leu	Thr	Val	Leu	His 330	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 335	Gly	
30	Lys	Glu	Tyr	Lys 340	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 345	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 350	Pro	Ile	
35	Glu	Lys	Thr 355	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 360	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 365	Pro	Gln	Val	
40	Tyr	Thr 370	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 375	Glu	Glu	Met	Thr	Lys 380	Asn	Gln	Val	Ser	
45	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys 390	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 395	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 400	
50	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 405	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 410	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 415	Pro	
55	Val	Leu	Asp	Ser 420	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 425	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 430	Thr	Val	
60	Asp	Lys	Ser 435	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 440	Asn	Val	Phe	Ser	Cys 445	Ser	Val	Met	
65	His	Glu 450	Ala	Leu	His	Asn	His 455	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 460	Leu	Ser	Leu	Ser	
	Pro	Gly	Lys														
	465																
60	<210> 93 <211> 39 <212> PRT <213> Artificial																

ES 2 900 328 T3

5 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de péptido agonista de GLP-1 (exenatida)

<400> 93

10 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
 1 5 10 15

15 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

20 <210> 94
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de péptido agonista de GLP-1 (Liraglutide)

<400> 94

30 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15

35 Gln Ala Ala Lys Glu Glu Phe Ile Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30

Gly

40 <210> 95
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> hormona de crecimiento humana (somatotropina)

<400> 95

50 Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg
 1 5 10 15

55 Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu
 20 25 30

60 Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro
 35 40 45

Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg

65

ES 2 900 328 T3

	50		55		60														
5	Glu 65	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys 70	Ser	Asn	Leu	Glu	Leu 75	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu 80			
10	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser 85	Trp	Leu	Glu	Pro	Val 90	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser 95	Val			
15	Phe	Ala	Asn	Ser 100	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala 105	Ser	Asp	Ser	Asn	Val 110	Tyr	Asp			
20	Leu	Leu	Lys 115	Asp	Leu	Glu	Glu	Gly 120	Ile	Gln	Thr	Leu	Met 125	Gly	Arg	Leu			
25	Glu	Asp 130	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Gly 135	Gln	Ile	Phe	Lys 140	Gln	Thr	Tyr	Ser			
30	Lys 145	Phe	Asp	Thr	Asn 150	Ser	His	Asn	Asp	Asp	Ala 155	Leu	Leu	Lys	Asn 160	Tyr			
35	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys 165	Phe	Arg	Lys	Asp	Met 170	Asp	Lys	Val	Glu	Thr 175	Phe			
40	Leu	Arg	Ile	Val 180	Gln	Cys	Arg	Ser	Val 185	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly 190	Phe				
45	<210> 96	<211> 5	<212> PRT	<213> Artificial															
50	<220>	<223> péptido	<400> 96																
55																			
60																			
65																			

ES 2 900 328 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> péptido

<400> 98

10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 99
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> péptido

20 <400> 99

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5

25 <210> 100
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> péptido

35 <400> 100

Ala Ala Pro Phe
1

40 <210> 101
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> péptido

<400> 101

50 Gly Gly Phe
1

55 <210> 102
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial

60 <220>
<223> péptido

<400> 102

65 Ala Ala Pro Val
1

5	<p><210> 103 <211> 3 <212> PRT <213> Artificial</p>	
10	<p><220> <223> péptido</p> <p><400> 103</p>	<p>Gly Gly Leu 1</p>
15		
20	<p><210> 104 <211> 3 <212> PRT <213> Artificial</p>	
25	<p><220> <223> péptido</p> <p><400> 104</p>	<p>Ala Ala Leu 1</p>
30		
35	<p><210> 105 <211> 3 <212> PRT <213> Artificial</p>	
40	<p><220> <223> péptido</p> <p><400> 105</p>	<p>Phe Val Arg 1</p>
45	<p><210> 106 <211> 3 <212> PRT <213> Artificial</p>	
50	<p><220> <223> péptido</p> <p><400> 106</p>	
55		<p>Val Gly Arg 1</p>
60	<p><210> 107 <211> 4 <212> PRT <213> Artificial</p>	
65	<p><220> <223> péptido</p>	

5	<p><210> 114 <211> 6 <212> PRT <213> Artificial</p> <p><220> <223> péptido D = decanoil X = cualquier aminoácido</p>
10	<p><220> <221> característica_misc <222> (6)..(6) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural</p>
15	<p><400> 114</p> <p style="text-align: center;">Asp Arg Val Arg Arg Xaa 1 5</p>
20	<p><210> 115 <211> 6 <212> PRT <213> Artificial</p>
25	<p><220> <223> péptido X = cualquier aminoácido</p>
30	<p><220> <221> característica_misc <222> (2)..(2) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural</p>
35	<p><220> <221> característica_misc <222> (6)..(6) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural</p>
40	<p><400> 115</p> <p style="text-align: center;">Pro Xaa Trp Val Pro Xaa 1 5</p>
45	<p><210> 116 <211> 4 <212> PRT <213> Artificial</p>
50	<p><220> <223> péptido X = cualquier aminoácido</p>
55	<p><220> <221> característica_misc <222> (4)..(4) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural</p>
60	<p><400> 116</p> <p style="text-align: center;">Trp Val Ala Xaa 1</p>
65	<p><210> 117 <211> 4</p>

<212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> péptido X = cualquier aminoácido

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(4)
 15 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

 <400> 117

 20 **Xaa Phe Xaa Xaa**
1

 <210> 118
 <211> 4
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> péptido X = cualquier aminoácido
 30

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 35

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 40

 <400> 118

 45 **Xaa Tyr Xaa Xaa**
1

 <210> 119
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 50

 <220>
 <223> péptido X = cualquier aminoácido

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 55

 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 60

 <400> 119
 65

ES 2 900 328 T3

Xaa Trp Xaa Xaa
1

5

<210> 120
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial

10

<220>
<223> péptido

15

<400> 120

Asp Arg Tyr Ile Pro Phe His Leu Leu Val Ala Pro Tyr Ser Pro Ala
1 5 10 15

20

<210> 121
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

25

<220>
<223> péptido

<400> 121

30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser
1 5 10 15

35

<210> 122
<211> 590
<212> PRT
<213> Artificial

40

<220>
<223> secuencia de aminoácidos de una Cholix415-TEV-IL-10 molécula de fusión

45

50

55

60

65

ES 2 900 328 T3

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

ES 2 900 328 T3

Cys Trp Leu Val Pro Ile 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
 10
 Ala Gly Thr Pro Lys Ala Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
 245 250 255
 15
 Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Lys Asn Ala Met Glu Ala
 260 265 270
 20
 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 Pro Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Asn
 290 295 300
 25
 Ala Gln Gln Ile Val Ser Leu Phe Leu Ala Thr Arg Ile Leu Phe Thr
 305 310 315 320
 30
 His Ile Asp Ser Ile Phe Thr Leu Asn Leu Asp Gly Gln Glu Pro Glu
 325 330 335
 35
 Val Ala Glu Arg Leu Asp Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro
 340 345 350
 40
 Gly Met Val Ile 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
 45
 Ala Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys
 385 390 395 400
 50
 Ser Cys Val Ala Ser Asn Ser Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser
 405 410 415
 55
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Pro
 420 425 430
 Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn
 435 440 445
 60
 Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys
 450 455 460
 65

ES 2 900 328 T3

5 Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu
465 470 475 480

10 Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser
485 490 495

15 Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn
500 505 510

20 Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu
515 520 525

25 Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys
530 535 540

30 Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys
545 550 555 560

35 Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe
565 570 575

40 Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
580 585 590

45 <210> 123
<211> 590
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> secuencia de aminoácidos de una Cholix415-(G4S)3-IL-10 molécula de fusión

55 <400> 123

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

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

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

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

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

ES 2 900 328 T3

Val Ser Gln Asp Ala Pro Phe Gly Val Ile Asn Leu Asp Ile Thr Thr
 85 90 95
 5
 Glu Asn Gly Thr Lys Thr Tyr Ser Phe Asn Arg Lys Glu Ser Glu Phe
 100 105 110
 10
 Ala Ile Asn Trp Leu Val Pro Ile Gly Glu Asp Ser Pro Ala Ser Ile
 115 120 125
 15
 Lys Ile Ser Ile Asp Glu Leu Asp Gln Gln Arg Asn Ile Ile Glu Val
 130 135 140
 20
 Pro Lys Leu Tyr Ser Ile Asp Leu Asp Asn Gln Thr Leu Glu Gln Trp
 145 150 155 160
 25
 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
 35
 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 Ile Asp Ala Ile Tyr Asn Tyr Ile Thr Gln Gln
 210 215 220
 45
 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 Ala Ile Thr Val Lys Gln Gly Ile Glu Gln Lys
 245 250 255
 55
 Pro Val Glu Gln Arg Ile His Phe Ser Lys Lys Asn Ala Met Glu Ala
 260 265 270
 60
 Leu Ala Ala His Arg Val Cys Gly Val Pro Leu Glu Thr Leu Ala Arg
 275 280 285
 65
 Ser Arg Lys Pro Arg Asp Leu Pro Asp Asp Leu Ser Cys Ala Tyr Asn
 290 295 300
 Ala Gln Gln Ile Val Ser Leu Phe Leu Ala Thr Arg Ile Leu Phe Thr
 305 310 315 320
 His Ile Asp Ser Ile Phe Thr Leu Asn Leu Asp Gly Gln Glu Pro Glu
 325 330 335

ES 2 900 328 T3

Val Ala Glu Arg Leu Asp Asp Leu Arg Arg Ile Asn Glu Asn Asn Pro
 340 345 350
 5
 Gly Met Val Ile Gln Val Leu Thr Val Ala Arg Gln Ile Tyr Asn Asp
 355 360 365
 10
 Tyr Val Thr His His Pro Gly Leu Thr Pro Glu Gln Thr Ser Ala Gly
 370 375 380
 15
 Ala Gln Ala Ala Asp Ile Leu Ser Leu Phe Cys Pro Asp Ala Asp Lys
 385 390 395 400
 20
 Ser Cys Val Ala Ser Asn Ser Asp Gln Ala Asn Ile Asn Ile Glu Ser
 405 410 415
 25
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro
 420 425 430
 30
 Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn
 435 440 445
 35
 Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys
 450 455 460
 40
 Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu
 465 470 475 480
 45
 Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser
 485 490 495
 50
 Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn
 500 505 510
 55
 Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu
 515 520 525
 60
 Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys
 530 535 540
 65
 Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys
 545 550 555 560
 Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe
 565 570 575
 Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 580 585 590

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de fusión de origen no natural y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, formulada para administración oral a un sujeto, en donde la molécula de fusión comprende una toxina de Cholix modificada acoplada a una IL-10, en donde la toxina de Cholix no es tóxica, y en donde la molécula de fusión tiene la capacidad de activar un receptor de IL-10;
- 10 en donde la toxina de Cholix modificada está truncada en un residuo de aminoácidos dentro del dominio II de la toxina de Cholix; y
 en donde la IL-10 es interleucina-10 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82 o un fragmento o variante de la misma, en donde el fragmento o variante contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de por lo menos aproximadamente el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.
- 15 2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la toxina de Cholix modificada se acopla a la IL-10 mediante un conector no escindible.
- 20 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el conector no escindible comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 o SEQ ID NO: 99.
4. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-3, en donde la toxina de Cholix modificada tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 3-41.
- 25 5. Una composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis o sepsis bacteriana.
- 30 7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad inflamatoria es la enfermedad inflamatoria intestinal.
- 35 8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la enfermedad inflamatoria intestinal es enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de derivación, síndrome de Behcet o colitis indeterminada.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde la IL-10 es interleucina-10 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82.
- 40 10. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, en donde la IL-10 es un fragmento o variante de interleucina-10 humana que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 82, en donde el fragmento o variante contiene una secuencia de aminoácidos que comparte una homología observada de por lo menos aproximadamente el 85% con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82.
- 45

Molécula de Fusión Cholix⁴¹⁵-TEV-IL-10

MVEEALNIFD ECRSPCSLTP EPGKPIQSKL SIPGDVVLDE GVLYYSMTIN DEQNDIKDED KGESIITIGE
 FATVRATRHY VSQDAPFGVI NLDITTENGT KTYSEFNKES EFAINWLVPI GEDSPASI KI SIDELDQQRN
 IIEVPKLYSI DLDNQTLQW KTQGNVSFSV TRPEHNIAIS WPSVSYKAAQ KEGSRHHRWA HWHITGLALCW
 LVPIDAIYNY ITQQNCTLGD NWFGGSYETV AGTPKAITVK QGIEQKPVEQ RIHFSKKNAM EALAAHRVCG
 VPLETLARSR KPRDLPDDL S CAYNAQQIVS LFLATRILFT HIDSIFTLNL DGQEPEVAER LDDLRRINEN
 NPGMVIQVLT VARQIYNDYV THHPGLTPEQ TSAGAQAADI LSLFCPDADK SCVASNSDQA NINIES**GGGG**
SGGGENLYFQ SPGQGTQSEN SCTHFPGNLP NMLRDLRDAF SRVKTFQMK DQLDNLLLKE SLEDFKGYL
 GCQALSEMIQ FYLEEVMPPA ENQDPDIKAH VNSLGENLKT LRLRLRRCHR FLPCENKSKA VEQVKNAFNK
 LQEKGIYKAM SEFDIFINYI EAYMTMKIRN (SEQ ID NO: 122)

Molécula de Fusión Cholix⁴¹⁵-(G₄S)₃-IL-10

MVEEALNIFD ECRSPCSLTP EPGKPIQSKL SIPGDVVLDE GVLYYSMTIN DEQNDIKDED KGESIITIGE
 FATVRATRHY VSQDAPFGVI NLDITTENGT KTYSEFNKES EFAINWLVPI GEDSPASI KI SIDELDQQRN
 IIEVPKLYSI DLDNQTLQW KTQGNVSFSV TRPEHNIAIS WPSVSYKAAQ KEGSRHHRWA HWHITGLALCW
 LVPIDAIYNY ITQQNCTLGD NWFGGSYETV AGTPKAITVK QGIEQKPVEQ RIHFSKKNAM EALAAHRVCG
 VPLETLARSR KPRDLPDDL S CAYNAQQIVS LFLATRILFT HIDSIFTLNL DGQEPEVAER LDDLRRINEN
 NPGMVIQVLT VARQIYNDYV THHPGLTPEQ TSAGAQAADI LSLFCPDADK SCVASNSDQA NINIES**GGGG**
SGGGGSGGGG SPGQGTQSEN SCTHFPGNLP NMLRDLRDAF SRVKTFQMK DQLDNLLLKE SLEDFKGYL
 GCQALSEMIQ FYLEEVMPPA ENQDPDIKAH VNSLGENLKT LRLRLRRCHR FLPCENKSKA VEQVKNAFNK
 LQEKGIYKAM SEFDIFINYI EAYMTMKIRN (SEQ ID NO: 123)

FIG. 1

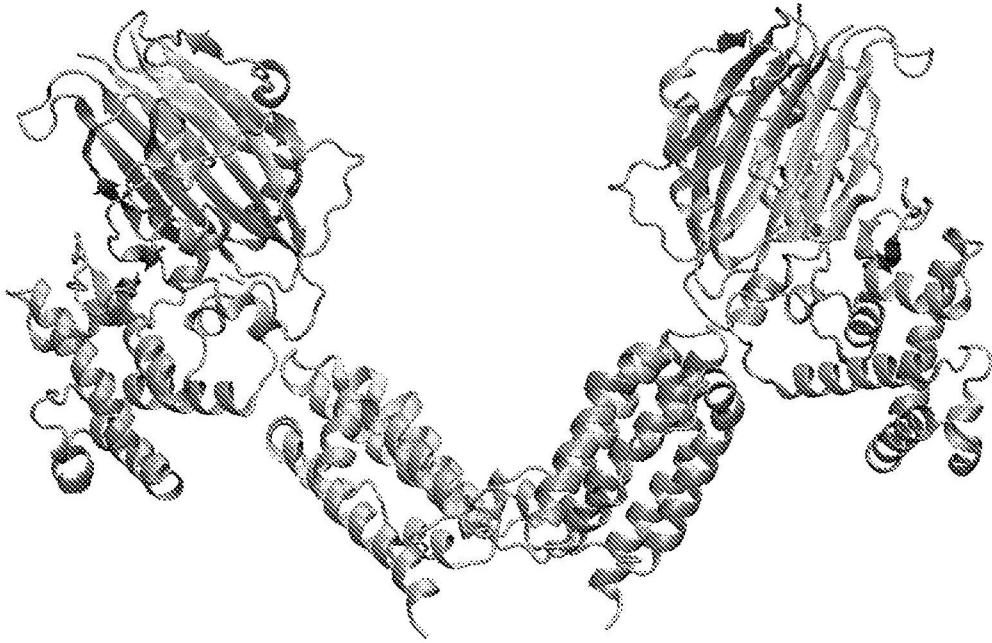


FIG. 2

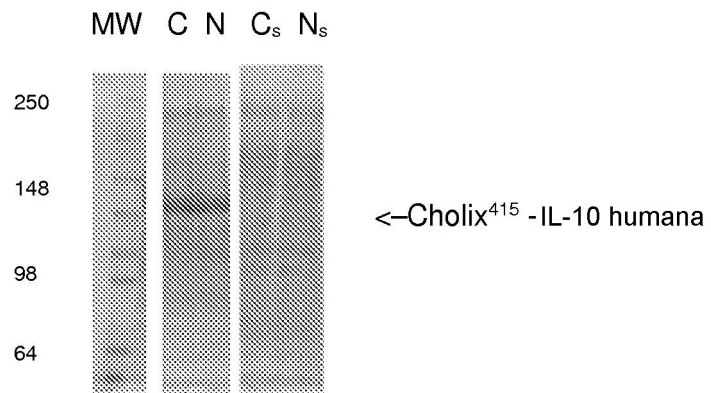


FIG. 3

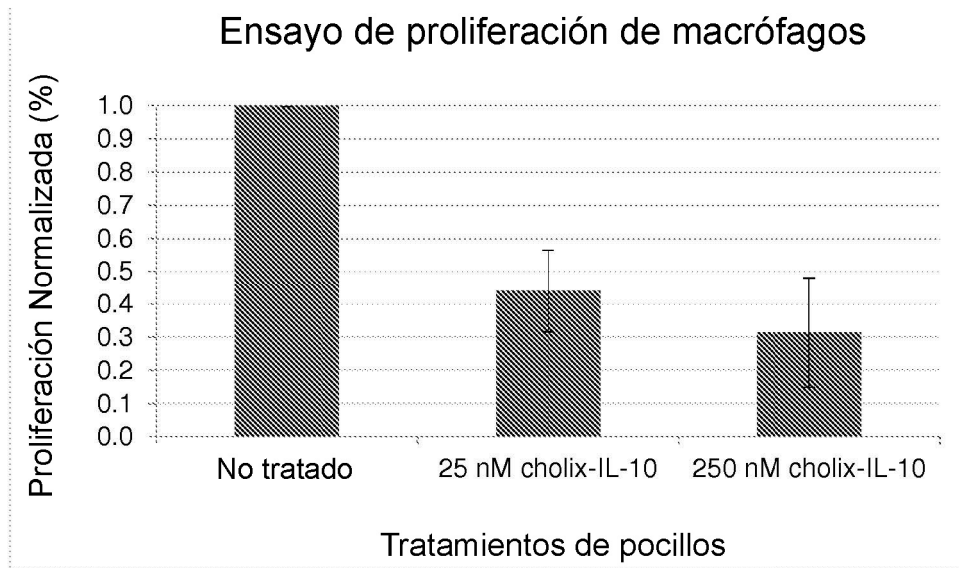


FIG. 4

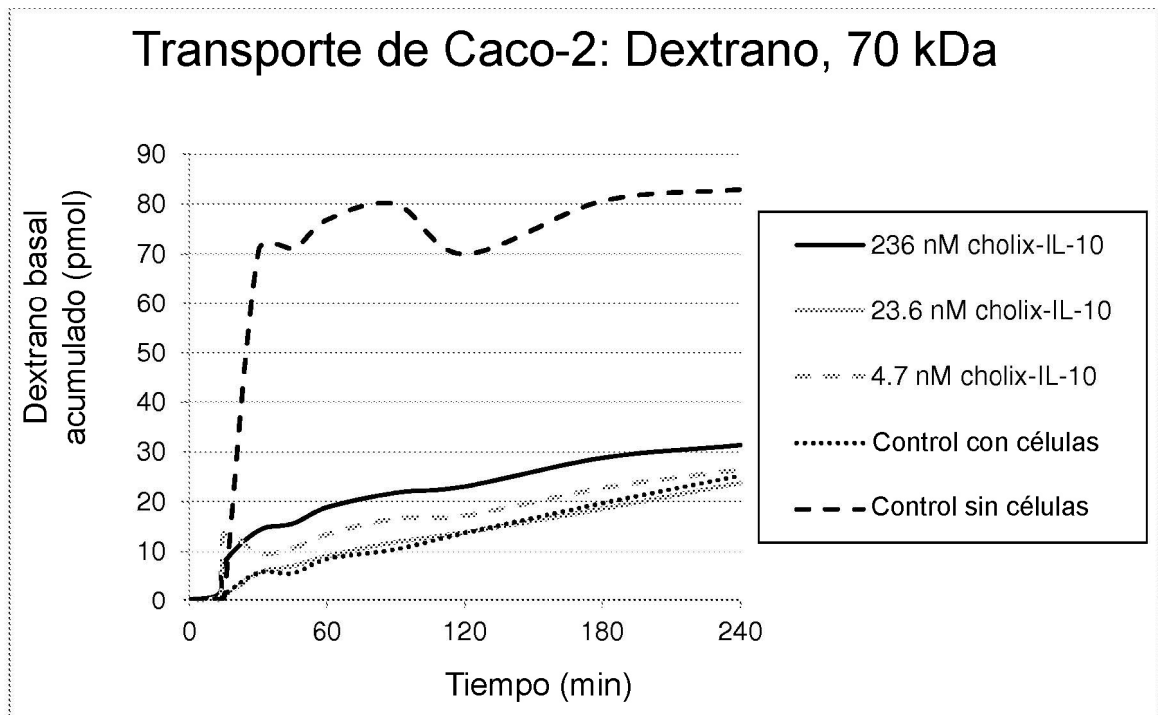


FIG. 5

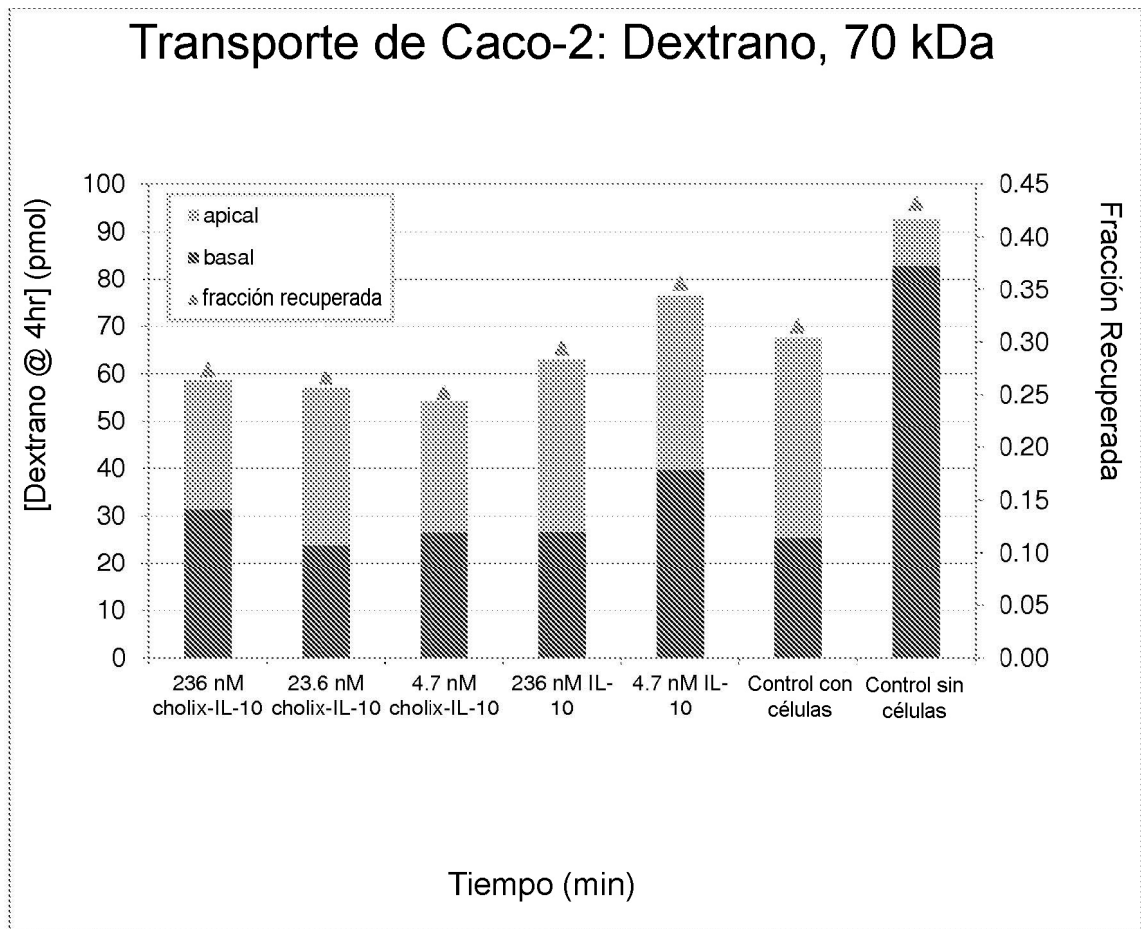
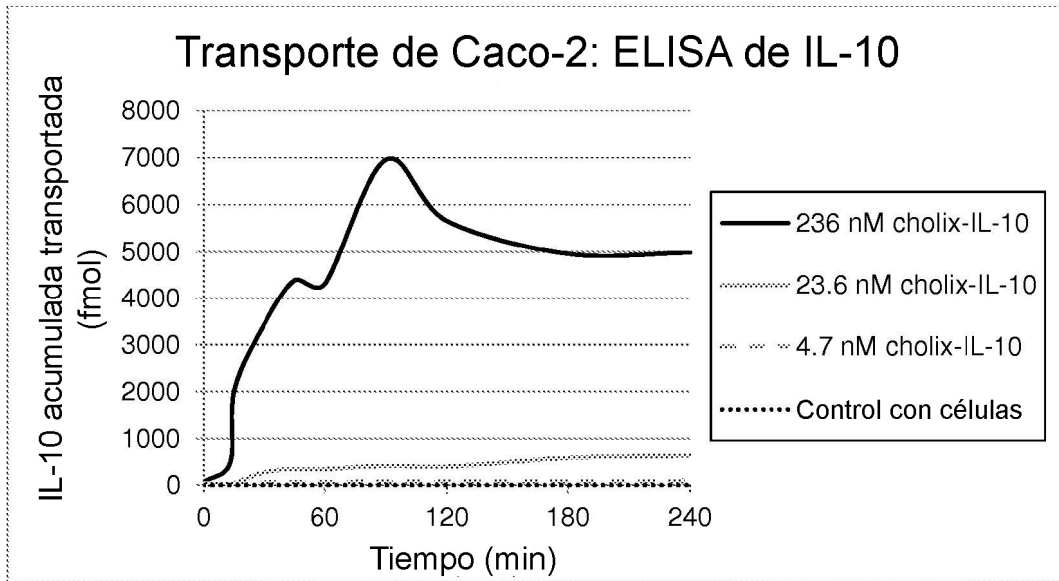


FIG. 6

A



B

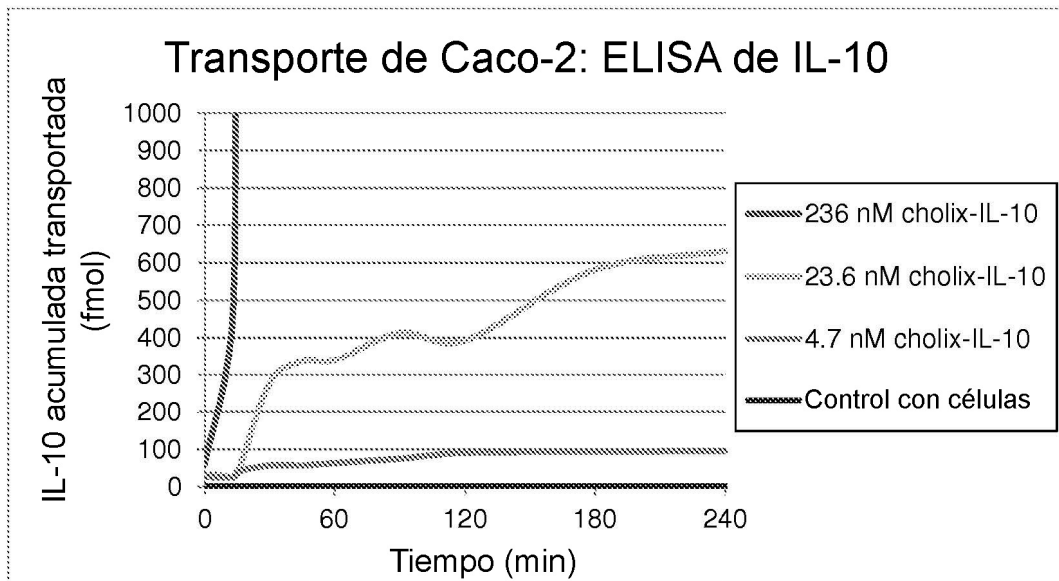


FIG. 7