VEHÍCULOS DERIVADOS DE CHOLIX PARA SUMINISTRO ORAL DE CARGA ÚTIL HETERÓLOGA

Referencia Cruzada

[0001] Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud PCT No. PCT/US2019/021474, presentada el 8 de marzo de 2019, y las solicitudes provisionales de Estados Unidos Nos. 62/888,144, presentada el 16 de agosto de 2019; 888,400, presentada el 16 de agosto de 2019; 62/888,133, presentada el 16 de agosto de 2019; 62/816,022, presentada el 8 de marzo de 2019; y 62/756,889 presentada el 7 de noviembre de 2018, cuyas solicitudes se incorporan en la presente a manera de referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Antecedentes de la Invención

[0002] El epitelio intestinal ha frustrado los esfuerzos para administrar oralmente grandes moléculas terapéuticas, tal como proteínas, debido a que las proteínas no se pueden difundir a través de la barrera epitelial intacta o cruzar la barrera a través de las estrechas uniones. Una vez captada por una célula epitelial, una proteína terapéutica ya sea ingresa a la ruta destructiva de tráfico lisosómico o se libera de nuevo en el lumen intestinal. Esta incapacidad de ser transportada fácilmente a través del epitelio intestinal continúa siendo un factor limitante en el desarrollo de formulaciones orales comercialmente viables, particularmente

para agentes terapéuticos basados en polipéptido. Una solución común es usar la administración parenteral tal como administración intravenosa o subcutánea, pero estas vías de administración pueden crear frecuentemente efectos secundarios considerables, reducir la eficacia terapéutica y reducir la conveniencia del paciente que puede afectar negativamente el cumplimiento. Existe la necesidad de composiciones mejoradas y métodos para transportar agentes terapéuticos en o a través de un epitelio, por ejemplo, un epitelio intestinal.

Incorporación a Manera de Referencia

[0003] Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente a manera de referencia al mismo grado como si cada publicación individual, patente, o solicitud de patente se indicara de manera específica e individualmente para que se incorpore por referencia.

Breve Descripción de la Invención

[0004] En un aspecto, la presente descripción proporciona un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo capaz de endocitosis en una célula epitelial polarizada y acumularse en una región de la célula, en donde la carga útil es heteróloga al vehículo. En algunas modalidades, la región es un compartimiento apical, un compartimiento supranuclear, o un compartimiento basal. En algunas modalidades, el

vehículo se retiene en la región durante al menos 5 minutos, 10 minutos, o 15 minutos en la región. En algunas modalidades, el vehículo se deriva de un polipéptido de Cholix. En algunas modalidades, el vehículo es un polipéptido que tiene una secuencia de Cholix con un extremo C en cualquiera de las posiciones 150-195. En algunas modalidades, el vehículo es un polipéptido que tiene una secuencia de Cholix con un extremo N en cualquiera de las posiciones 1-41. En algunas modalidades, el vehículo es un polipéptido que tiene una secuencia de Cholix con un truncamiento de extremo N en cualquiera de las posiciones 35-40. En algunas modalidades, el vehículo es un polipéptido que tiene una secuencia de Cholix con un extremo C en cualquiera de las posiciones 150-205. En algunas modalidades, el vehículo consta de los residuos de aminoácidos de la posición N-terminal 40 a cualquiera de las posiciones C-terminales 150-205 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo tiene un extremo C en posiciones 150 o 187 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 137. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 137-139. En algunas modalidades, la numeración de posición es con base en la alineación del polipéptido de Cholix a la secuencia

expuesta en SEQ ID NO: 130, en donde las posiciones se numeran de un extremo N a un extremo C iniciando con la posición 1 en el extremo N. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de permanecer asociado con un receptor de entrada apical más tiempo después de la endocitosis del vehículo en la célula epitelial polarizada que un vehículo capaz de la transcitosis a través de la célula epitelial polarizada. En algunas modalidades, el receptor de entrada apical es un receptor de TMEM132. En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada comprende una célula epitelial gastrointestinal polarizada.

[0005] En un aspecto, la presente descripción proporciona un complejo de vehículo-carga útil que comprende (i) un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene un extremo C en cualquiera de las posiciones 195-347 y capaz de someterse a transcitosis a través de una célula epitelial polarizada, acoplada a (ii) una carga útil heteróloga. En algunas modalidades, la numeración de posición es con base en la alineación del polipéptido de Cholix a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130, en donde las posiciones se numeran de un extremo N a un extremo C iniciando con la posición 1 en el extremo N. En algunas modalidades, el extremo C está en cualquiera de las posiciones 195-266. En algunas modalidades, el extremo C está en cualquiera de las posiciones 195-266 de cualquiera de las secuencias expuestas

en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el extremo C está en cualquiera de las posiciones 206, 245, 251, o 266, una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el extremo C está en cualquiera de las posiciones 206, 245, 251, o 266 de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el extremo C está en la posición 206 de cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 131 o 184. En algunas modalidades, el extremo C está en la posición 245 de cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 132 o 183. En algunas modalidades, el extremo C está en la posición 251 de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 133 o 182. En algunas modalidades, el extremo C está en la posición 266 de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 134 o 181. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78 con el truncamiento en cualquiera de las posiciones 195-347, y no tiene más de 5, 4, 3, 2, o 1 variaciones de aminoácidos en cualquiera de las posiciones 1-40, 133-151, 152-187, o 188-206 de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78.

[0006] En un aspecto, la presente descripción proporciona

un complejo de vehículo-carga útil que comprende (i) un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de endocitosis en una célula epitelial polarizada o transcitosis de una célula epitelial polarizada, acoplada a (ii) una carga útil heteróloga. En algunas modalidades, el vehículo comprende un ácido glutámico en la posición 3 y una alanina en la posición 4. En algunas modalidades, el vehículo no es tóxico. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de someter a transcitosis a la carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada. En algunas modalidades, el vehículo comprende un fragmento capaz de transcitosis de una célula epitelial polarizada, en donde el vehículo tiene un extremo C en cualquiera de las posiciones 195 a un residuo C-terminal de la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el extremo C está en cualquiera de las posiciones 195-386 de la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el extremo C está en la posición 386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el extremo C está en la posición 386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 135.

[0007] En un aspecto, la presente descripción proporciona un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que no comprende SEQ ID NO: 179, y no consta de SEQ ID NO: 126, formado en complejo con (ii) una carga útil heteróloga, en donde el vehículo es capaz de (a) someter a transcitosis a la carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada; o (b) transportar la carga útil heteróloga en la célula epitelial polarizada. En algunas modalidades, el vehículo comprende al menos 75% de identidad de secuencia a una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130, o fragmento de la misma. En algunas modalidades, el vehículo comprende al menos 90% de identidad de secuencia a una variante de Cholix expuesta en SEQ ID NO: 130, o un fragmento de la misma. En algunas modalidades, el polipéptido de Cholix es una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130, o fragmento de la misma. En algunas modalidades, el vehículo comprende un ácido glutámico en la posición 3 y una alanina en la posición 4. En algunas modalidades, el vehículo no es tóxico. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de someter a transcitosis a la carga útil heteróloga a través de la célula epitelial polarizada. En algunas modalidades, el vehículo tiene un truncamiento C-terminal en cualquiera de las posiciones 195-633 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en cualquiera de las posiciones 195-386 de la secuencia

expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo tiene un truncamiento C-terminal en cualquiera de las posiciones 195-386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2. En algunas modalidades, el complejo de vehículo-carga útil comprende una metionina N-terminal. En algunas modalidades, el vehículo se conjuga sintéticamente a la carga útil heteróloga. En algunas modalidades, el vehículo se fusiona genéticamente a la carga útil heteróloga. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga es una carga útil terapéutico. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una citocina, un anticuerpo, una hormona, o un ácido nucleico. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una citocina. En algunas modalidades, la citocina es una interleucina. En algunas modalidades, la interleucina es una IL-10. En algunas modalidades, la IL-10 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 145. En algunas modalidades, la interleucina es una IL-22. En algunas modalidades, la IL-22 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90%

de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 142. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una hormona. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una hormona de crecimiento humano. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga se acopla covalentemente al vehículo. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga se acopla a una C-terminal del vehículo. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga se acopla a una N-terminal del vehículo. En algunas modalidades, el vehículo se acopla a la carga útil heteróloga a través de un espaciador. En algunas modalidades, el espaciador es un espaciador no escindible. En algunas modalidades, el espaciador comprende entre 1 y 100 residuos de aminoácidos. En algunas modalidades, el espaciador comprende hasta 15 repeticiones de GS, GGS, GGGS, GGGGS, GGGGGS, o una combinación de las mismas. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 175. En algunas modalidades, el espaciador consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 176. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga no se acopla covalentemente al vehículo. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga se forma en complejo con el vehículo a través

de una nanopartícula.

[0008] En un aspecto, la presente descripción proporciona un método de transcitosis de una carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada, que comprende: (a) poner en contacto una membrana apical de la célula epitelial polarizada con un complejo de vehículo-carga útil; y (b) someter a transcitosis el complejo de vehículo-carga útil a través de la célula epitelial polarizada, en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través de la célula epitelial polarizada, acoplado a la carga útil heteróloga. En algunas modalidades, poner en contacto la membrana apical de la célula epitelial polarizada con el complejo de vehículo-carga útil comprende interacción del vehículo con el receptor de entrada apical TMEM132. En algunas modalidades, la interacción del vehículo con la proteína de membrana TMEM132 da por resultado endocitosis mediada por receptor del complejo de vehículo-carga útil. En algunas modalidades, el vehículo que interactúa con TMEM132 comprende los residuos de aminoácidos 135151 de SEQ ID NO: 130, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma. En algunas modalidades, la transcitosis del complejo de

vehículo-carga útil a través de la célula epitelial polarizada comprende la interacción del vehículo con cualquiera de uno o más de GRP75, ERGIC-53, y perlecan. En algunas modalidades, la transcitosis del complejo de vehículo-carga útil a través de la célula epitelial polarizada comprende además co-localización del complejo de vehículo-carga útil con cualquiera de uno o más de COPI, EEA1, y Rab7 en el lado apical, y con Rab11a en el lado basal de la célula epitelial. En algunas modalidades, el vehículo que interactúa con GRP7 o ERGIC-53 comprende los residuos de aminoácidos 1-40 y 152-187 de SEQ ID NO: 130, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma. En algunas modalidades, el vehículo que interactúa con el perlecan comprende los residuos de aminoácidos 188-205 de SEQ ID NO: 130, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma. En algunas modalidades, el método puede comprender además, subsecuente a (b) administrar el complejo de vehículo-carga útil en la *lámina propria*. En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada es una célula epitelial intestinal polarizada.

[0009] En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para administrar oralmente una carga útil heteróloga a un sujeto, que comprende: administrar oralmente un complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de

vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, administrando de esta manera la carga útil heteróloga al sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00010] En un aspecto, la presente descripción proporciona un complejo de vehículo-carga útil para administrar oralmente una carga útil heteróloga al sujeto mediante un método que comprende: administrar oralmente el complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, tratando de esta manera una enfermedad del sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00011] En un aspecto, la presente descripción proporciona el uso de un complejo de vehículo-carga útil para administrar oralmente una carga útil heteróloga a un sujeto por un método

que comprende: administrar oralmente el complejo de vehículo-carga útil al sujeto; en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, tratando de esta manera una enfermedad en el sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00012] En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto, que comprende: administrar oralmente un complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de transcitosis del complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, por lo cual se trata una enfermedad en el sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00013] En un aspecto, la presente descripción proporciona un complejo de vehículo-carga útil para uso en el tratamiento

de una enfermedad en un sujeto mediante un método que comprende: administrar oralmente el complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, tratando de esta manera la enfermedad en el sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00014] En un aspecto, la presente descripción proporciona el uso de un complejo de vehículo-carga útil en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un método que comprende: administrar oralmente el complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, tratando de esta manera la enfermedad en el sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio, acoplado a la

carga útil heteróloga. En algunas modalidades, el método comprende además la unión de la carga útil heteróloga a un receptor en la *lamina propria*. En algunas modalidades, el método comprende además administrar la carga útil heteróloga en la circulación sistémica. En algunas modalidades, el vehículo es un polipéptido derivado de Cholix. En algunas modalidades, el vehículo comprende los residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, o 1-386 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo comprende los residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, o 1-386 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1-2. En algunas modalidades, el vehículo comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 131-135 o 180-184. En algunas modalidades, el epitelio polarizado es un epitelio intestinal polarizado. En algunas modalidades, la enfermedad es colitis ulcerosa, pouchitis, proctitis, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), artritis reumatoide o psoriasis. En algunas modalidades, la enfermedad es colitis ulcerosa. En algunas modalidades, la colitis ulcerativa es leve a moderada o moderada a grave. En algunas modalidades, la enfermedad es enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad de Crohn fistulante. En algunas modalidades, la carga útil es una interleucina. En algunas

modalidades, la interleucina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 o 145.

[00015] En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para transportar una carga útil heteróloga a una célula epitelial polarizada, que comprende: (a) poner en contacto la membrana apical de la célula epitelial polarizada con un complejo de vehículo-carga útil; y (b) transportar el complejo de vehículo-carga útil a la célula epitelial polarizada, en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Cholix expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a la célula epitelial, acoplada a la carga útil heteróloga. En algunas modalidades, poner en contacto la membrana apical de la célula epitelial polarizada con el complejo de vehículo-carga útil comprende interacción del vehículo con el receptor de entrada apical TMEM132. En algunas modalidades, la interacción del vehículo con el receptor de entrada apical TMEM132 da por resultado endocitosis mediada por receptor del complejo de vehículo-carga útil. En algunas modalidades, el método comprende además transportar la carga útil heteróloga a un compartimiento apical o un compartimiento basal. En algunas modalidades, el vehículo del complejo de vehículo-carga útil

permanece asociado con TMEM132 después de la endocitosis. En algunas modalidades, el vehículo que interactúa con TMEM132 comprende residuos de aminoácidos 135-151 de SEQ ID NO: 130, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma. En algunas modalidades, el vehículo es un polipéptido derivado de Cholix. En algunas modalidades, el vehículo consta de residuos de aminoácidos 1-151, 1-187, 41-187, o 40-205 de una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo consta de residuos de aminoácidos 1-151, 1-187, 41-187, o 40-205 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1-2. En algunas modalidades, el vehículo consta de cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 136-139. En algunas modalidades, el vehículo no se acopla covalentemente a la carga útil heteróloga a través de una nanopartícula. En algunas modalidades, una relación de la carga útil heteróloga al vehículo en la nanopartícula es al menos 15,000:1. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga es un agente reductor de glucosa. En algunas modalidades, el agente reductor de glucosa no se asocia covalentemente con la nanopartícula. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga es un ARNip. En algunas modalidades, el ARNip no se asocia covalentemente con la nanopartícula. En algunas modalidades, el vehículo se liga covalentemente a la nanopartícula o se seca por pulverización sobre la

nanopartículas.

[00016] En un aspecto, la presente descripción incluye un método que comprende transportar una carga útil heteróloga a una célula epitelial polarizada, que comprende: (a) poner en contacto la membrana apical de la célula epitelial polarizada con un complejo de vehículo-carga útil; y (b) transportar el complejo de vehículo-carga útil a la célula epitelial polarizada, en donde el complejo de vehículo-carga útil es el complejo de vehículo-carga útil que comprende cualquiera de los vehículos de endocitosis en la presente.

[00017] En un aspecto, la descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo capaz de acumularse en un compartimiento apical de una célula epitelial polarizada, al menos 5 minutos después de la endocitosis del vehículo, acoplado a una carga útil heteróloga.

[00018] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento apical de la célula epitelial polarizada, al menos 10 minutos después de la endocitosis del vehículo. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento apical de la célula epitelial polarizada, al menos 15 minutos después de la endocitosis del vehículo.

[00019] En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada comprende una célula epitelial gastrointestinal

polarizada. En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada comprende una célula epitelial polarizada gastrointestinal de rata.

[00020] En otro aspecto, la descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo capaz de acumularse en un compartimiento apical de una célula epitelial polarizada, al menos 5 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo a un tracto gastrointestinal de un mamífero, acoplado a una carga útil heteróloga.

[00021] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento apical de la célula epitelial polarizada, al menos 10 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo al tracto gastrointestinal del mamífero. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento apical de la célula epitelial polarizada, al menos 15 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo al tracto gastrointestinal del mamífero.

[00022] En algunas modalidades, la aplicación intraluminal comprende inyección intraluminal en un yeyuno de rata.

[00023] En otro aspecto, la descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo capaz de acumularse en un compartimiento supranuclear de una célula epitelial polarizada, al menos 5 minutos después de la

endocitosis del vehículo, acoplado a una carga útil heteróloga.

[00024] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento supranuclear de la célula epitelial polarizada, al menos 10 minutos después de la endocitosis del vehículo. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento supranuclear de la célula epitelial polarizada, al menos 15 minutos después de la endocitosis del vehículo.

[00025] En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada comprende una célula epitelial gastrointestinal polarizada. En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada comprende una célula epitelial polarizada gastrointestinal de rata.

[00026] En otro aspecto, la descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo capaz de acumularse en un compartimiento supranuclear de una célula epitelial polarizada, al menos 5 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo a un tracto gastrointestinal de un mamífero, acoplado a una carga útil heteróloga.

[00027] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento supranuclear de la célula epitelial polarizada, al menos 10 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo al tracto

gastrointestinal del mamífero. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento supranuclear de la célula epitelial polarizada, al menos 15 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo al vehículo del tracto gastrointestinal del mamífero.

[00028] En algunas modalidades, la aplicación intraluminal comprende inyección intraluminal en un yeyuno de rata.

[00029] En otro aspecto, la descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo capaz de acumularse en un compartimiento basal de una célula epitelial polarizada, al menos 5 minutos después de la endocitosis del vehículo, acoplado a una carga útil heteróloga.

[00030] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento basal de la célula epitelial polarizada, al menos 10 minutos después de la endocitosis del vehículo. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento basal de la célula epitelial polarizada, al menos 15 minutos después de la endocitosis del vehículo.

[00031] En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada comprende una célula epitelial gastrointestinal polarizada. En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada comprende una célula epitelial polarizada gastrointestinal de rata.

[00032] En otro aspecto, la descripción incluye un complejo

de vehículo-carga útil que comprende un vehículo capaz de acumularse en un compartimiento basal de una célula epitelial polarizada, al menos 5 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo a un tracto gastrointestinal de un mamífero, acoplado a una carga útil heteróloga.

[00033] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento basal de la célula epitelial polarizada, al menos 10 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo al tracto gastrointestinal del mamífero. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de acumularse en el compartimiento basal de la célula epitelial polarizada, al menos 15 minutos después de la aplicación intraluminal del vehículo al vehículo del tracto gastrointestinal del mamífero.

[00034] En algunas modalidades, la aplicación intraluminal comprende inyección intraluminal en un yeyuno de rata.

[00035] En otro aspecto, la descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene un extremo C en cualquiera de las posiciones 195-347, acoplado a una carga útil heteróloga. En algunas modalidades, la numeración de posición es con base en la alineación del polipéptido de Cholix a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130, en donde las posiciones se numeran de un extremo N a un extremo C iniciando con la posición 1 en el extremo N.

[00036] En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en cualquiera de las posiciones 195-266 de una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en cualquiera de las posiciones 195-266 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en cualquiera de las posiciones 206, 245, 251, o 266 una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en cualquiera de las posiciones 206, 245, 251, o 266 de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78.

[00037] En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 206 de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 131 o 184. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 245 de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 132 o 183. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 251 de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 133 o 182. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 266 de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de

aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 134 o 181. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78 con el truncamiento en cualquiera de las posiciones 195-347, y no tiene más de 5, 4, 3, 2, o 1 variaciones de aminoácidos en cualquiera de las posiciones 1-40, 133-151, 152-187, o 188-206 de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78.

[00038] En otro aspecto, la descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene un extremo N en las posiciones 1-41 y un extremo C en las posiciones 150-195, o que consta de los residuos de aminoácidos de cualquiera de las posiciones N-terminales 35-40 a cualquiera de las posiciones C-terminales 150-205 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130, acoplada a una carga útil heteróloga. En algunas modalidades, la numeración de posición es con base en la alineación del polipéptido de Cholix a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130, en donde las posiciones se numeran de un extremo N a un extremo C iniciando con la posición 1 en el extremo N.

[00039] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de permanecer asociado con un receptor de entrada apical después de la endocitosis del vehículo en una célula epitelial polarizada. En algunas modalidades, el receptor de entrada apical es un receptor TMEM132 (por ejemplo, TMEM132A).

[00040] En algunas modalidades, el vehículo consta de los

residuos de aminoácidos de la posición N-terminal 40 a cualquiera de las posiciones C-terminales 150-205 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo tiene un truncamiento C-terminal en las posiciones 150 o 186 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130.

[00041] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de transportar la carga útil a un compartimiento basal o un compartimiento supranuclear en una célula epitelial polarizada. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 136. En algunas modalidades, el vehículo es capaz de transportar la carga útil a un compartimiento apical en una célula epitelial polarizada.

[00042] En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 137-139.

[00043] En un aspecto, la presente descripción proporciona un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de endocitosis en una célula epitelial polarizada o transcitosis de una célula epitelial polarizada, acoplada a una carga útil heteróloga.

[00044] En algunas modalidades, el vehículo comprende un ácido glutámico en la posición 3 y una alanina en la posición 4.

[00045] En algunas modalidades, el vehículo no es tóxico.

[00046] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de someter a transcitosis a la carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada.

[00047] En algunas modalidades, el vehículo comprende un fragmento capaz de transcitosis de una célula epitelial polarizada, en donde el vehículo tiene un truncamiento C-terminal en cualquiera de las posiciones 195 a un residuo C-terminal de la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en cualquiera de las posiciones 195-386 de la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2. En algunas modalidades, el vehículo consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 135.

[00048] En otro aspecto, la descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil que comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que no comprende SEQ ID NO: 179, y

no consta de SEQ ID NO: 126, formado en complejo con una carga útil heteróloga, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis a la carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada; o transportar la carga útil heteróloga en la célula epitelial polarizada.

[00049] En algunas modalidades, el vehículo comprende al menos 75% de identidad de secuencia a una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130, o fragmento de la misma. En algunas modalidades, el vehículo comprende al menos 90% de identidad de secuencia a una variante de Cholix expuesta en SEQ ID NO: 130, o un fragmento de la misma. En algunas modalidades, el polipéptido de Cholix es una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130, o fragmento de la misma. En algunas modalidades, el vehículo comprende un ácido glutámico en la posición 3 y una alanina en la posición 4.

[00050] En algunas modalidades, el vehículo no es tóxico.

[00051] En algunas modalidades, el vehículo es capaz de someter a transcitosis a la carga útil heteróloga a través de la célula epitelial polarizada.

[00052] En algunas modalidades, el vehículo tiene un truncamiento C-terminal en cualquiera de las posiciones 195-633 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en cualquiera de las posiciones 195-386 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo tiene un

truncamiento C-terminal en cualquiera de las posiciones 195-386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2, o 4-78. En algunas modalidades, el truncamiento C-terminal está en la posición 386 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-2. En algunas modalidades, el complejo de vehículo-carga útil comprende una metionina N-terminal.

[00053] En algunas modalidades, el vehículo se conjuga sintéticamente a la carga útil heteróloga. En algunas modalidades, el vehículo se fusiona genéticamente a la carga útil heteróloga.

[00054] En algunas modalidades, la carga útil heteróloga es una carga útil terapéutico. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una citocina, un anticuerpo, una hormona, o un ácido nucleico. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una citocina. En algunas modalidades, la citocina es una interleucina.

[00055] En algunas modalidades, la interleucina es una IL-10. En algunas modalidades, la IL-10 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 145. En algunas modalidades, la interleucina es una IL-22. En algunas modalidades, la IL-22 comprende una secuencia

de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 142.

[00056] En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo anti-TNF. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una hormona. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una hormona de crecimiento humano.

[00057] En algunas modalidades, la carga útil heteróloga se acopla covalentemente al vehículo. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga se acopla a una C-terminal del vehículo. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga se acopla a una N-terminal del vehículo. En algunas modalidades, el vehículo se acopla a la carga útil heteróloga a través de un espaciador.

[00058] En algunas modalidades, el espaciador es un espaciador no escindible. En algunas modalidades, el espaciador comprende entre 1 y 100 residuos de aminoácidos. En algunas modalidades, el espaciador comprende hasta 15 repeticiones de GS, GGS, GGGS, GGGGS, GGGGGS, o una combinación de las mismas. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 175. En algunas modalidades, el espaciador consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 176.

[00059] En algunas modalidades, la carga útil heteróloga no

se acopla covalentemente al vehículo. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga se forma en complejo con el vehículo a través de una nanopartícula.

[00060] En un aspecto, la presente descripción incluye un polinucleótido que codifica para cualquiera de los complejos de vehículo-carga útil (por ejemplo, constructos de suministro) descritos en la presente, por ejemplo, aquellos que comprende, que constan esencialmente de, o que constan de cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 147-150, 152-159 o 188.

[00061] En un aspecto, la presente descripción incluye un vector que comprende cualquiera delos polinucleótidos que codifican un complejo de vehículo-carga útil (por ejemplo, constructo de suministro) de esta descripción.

[00062] En un aspecto, la presente descripción incluye un método para hacer pasar una carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada, que comprende: (a) poner en contacto una membrana apical de la célula epitelial polarizada con un complejo de vehículo-carga útil; y (b) someter a transcitosis el complejo de vehículo-carga útil a través de la célula epitelial polarizada, en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar

el complejo de vehículo-carga útil a través de la célula epitelial polarizada, acoplado a la carga útil heteróloga. En algunas modalidades, poner en contacto la membrana apical de la célula epitelial polarizada con el complejo de vehículo-carga útil comprende interacción del vehículo con el receptor de entrada apical TMEM132. En algunas modalidades, la interacción del vehículo con la proteína de membrana TMEM132 da por resultado endocitosis mediada por receptor del complejo de vehículo-carga útil. En algunas modalidades, el vehículo que interactúa con TMEM132 comprende los residuos de aminoácidos 135151 de SEQ ID NO: 130, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma. En algunas modalidades, la transcitosis del complejo de vehículo-carga útil a través de la célula epitelial polarizada comprende la interacción del vehículo con cualquiera de uno o más de GRP75 (por ejemplo, GRP75B), ERGIC-53, y perlecan. En algunas modalidades, la transcitosis del complejo de vehículo-carga útil a través de la célula epitelial polarizada comprende además co-localización del complejo de vehículo-carga útil con cualquiera de uno o más de COPI, EEA1, y Rab7 en el lado apical, y con Rab11a en el lado basal de la célula epitelial. En algunas modalidades, el vehículo que interactúa con GRP7 o ERGIC-53 comprende los residuos de aminoácidos 1-40 y 152-187 de SEQ ID NO: 130, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de

secuencia a la misma. En algunas modalidades, el vehículo que interactúa con el perlecan comprende los residuos de aminoácidos 188-205 de SEQ ID NO: 130, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma. En algunas modalidades, el método comprende además, subsecuente a (b) administrar el complejo de vehículo-carga útil en la *lámina propria*. En algunas modalidades, la célula epitelial polarizada es una célula epitelial intestinal polarizada.

[00063] En un aspecto, la presente descripción incluye un método para administrar oralmente una carga útil heteróloga a un sujeto, que comprende: administrar oralmente un complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, administrando de esta manera la carga útil heteróloga al sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio polarizado, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00064] En un aspecto, la presente descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil para administrar oralmente una carga útil heteróloga al sujeto mediante un método que comprende: administrar oralmente el complejo de vehículo-

carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, tratando de esta manera una enfermedad del sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio polarizado, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00065] En un aspecto, la presente descripción incluye el uso de un complejo de vehículo-carga útil para administrar oralmente una carga útil heteróloga a un sujeto por un método que comprende: administrar oralmente el complejo de vehículo-carga útil al sujeto; en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, tratando de esta manera una enfermedad en el sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio polarizado, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00066] En un aspecto, la presente descripción incluye un

método para tratar una enfermedad en un sujeto, que comprende: administrar oralmente un complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de transcitosis del complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, por lo cual se trata una enfermedad en el sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00067] En un aspecto, la presente descripción incluye un complejo de vehículo-carga útil para uso en el tratamiento de una enfermedad en un sujeto mediante un método que comprende: administrar oralmente el complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, tratando de esta manera la enfermedad en el sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio polarizado, acoplado a la carga útil heteróloga.

[00068] En un aspecto, la presente descripción incluye el uso de un complejo de vehículo-carga útil en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad en un método que comprende: administrar oralmente el complejo de vehículo-carga útil al sujeto, en donde el vehículo es capaz de someter a transcitosis al complejo de vehículo-carga útil a través de un epitelio polarizado, tratando de esta manera la enfermedad en el sujeto, y en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a través del epitelio, acoplado a la carga útil heteróloga. En algunas modalidades, el método comprende además la unión de la carga útil heteróloga a un receptor en la *lamina propria*. En algunas modalidades, el método comprende además administrar la carga útil heteróloga en la circulación sistémica. En algunas modalidades, el vehículo es un polipéptido derivado de Cholix. En algunas modalidades, el vehículo comprende los residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, o 1-386 de una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo comprende residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, o 1-386 de la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-2. En algunas modalidades, el vehículo

comprende cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 131-135 o 180-184. En algunas modalidades, el epitelio polarizado es un epitelio intestinal polarizado. En algunas modalidades, la enfermedad es colitis ulcerosa, pouchitis, proctitis, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple (MS), lupus eritematoso sistémico (SLE), enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD), artritis reumatoide o psoriasis. En algunas modalidades, la enfermedad es colitis ulcerosa. En algunas modalidades, la colitis ulcerativa es leve a moderada o moderada a grave. En algunas modalidades, la enfermedad es enfermedad de Crohn. En algunas modalidades, la enfermedad de Crohn es enfermedad de Crohn fistulante. En algunas modalidades, la carga útil es una interleucina. En algunas modalidades, la interleucina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 142 o 145.

[00069] En un aspecto, la presente descripción incluye un método para transportar una carga útil heteróloga a una célula epitelial polarizada, que comprende: (a) poner en contacto la membrana apical de la célula epitelial polarizada con un complejo de vehículo-carga útil; y (b) transportar el complejo de vehículo-carga útil a la célula epitelial polarizada, en donde el complejo de vehículo-carga útil comprende un vehículo que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Cholix expuesta en

cualquiera de SEQ ID NO: 1-2, 4-125, o 127-129, o un fragmento del mismo capaz de transportar el complejo de vehículo-carga útil a la célula epitelial, acoplada a la carga útil heteróloga. En algunas modalidades, poner en contacto la membrana apical de la célula epitelial polarizada con el complejo de vehículo-carga útil comprende interacción del vehículo con el receptor de entrada apical TMEM132. En algunas modalidades, la interacción del vehículo con el receptor de entrada apical TMEM132 da por resultado endocitosis mediada por receptor del complejo de vehículo-carga útil. En algunas modalidades, el método comprende además transportar la carga útil heteróloga a un compartimiento apical o un compartimiento basal. En algunas modalidades, el vehículo del complejo de vehículo-carga útil permanece asociado con TMEM132 después de la endocitosis. En algunas modalidades, el vehículo que interactúa con TMEM132 comprende residuos de aminoácidos 135-151 de SEQ ID NO: 130, o una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a la misma. En algunas modalidades, el vehículo es un polipéptido derivado de Cholix. En algunas modalidades, el vehículo consta de residuos de aminoácidos 1-151, 1-187, 41-187, o 40-205 de una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 130. En algunas modalidades, el vehículo consta de residuos de aminoácidos 1-151, 1-187, 41-187, o 40-205 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1-2. En algunas modalidades, el

vehículo consta de cualquiera de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 136-139. En algunas modalidades, el vehículo no se acopla covalentemente a la carga útil heteróloga a través de una nanopartícula. En algunas modalidades, una relación de la carga útil heteróloga al vehículo en la nanopartícula es al menos 15,000:1. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga es un agente reductor de glucosa. En algunas modalidades, el agente reductor de glucosa no se asocia covalentemente con la nanopartícula. En algunas modalidades, la carga útil heteróloga es un ARNip. En algunas modalidades, el ARNip no se asocia covalentemente con la nanopartícula. En algunas modalidades, el vehículo se liga covalentemente a la nanopartícula o se seca por pulverización sobre la nanopartículas.

Breve Descripción de las Figuras

[00070] Varias características de la presente descripción se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. El archivo de patente o solicitud contiene al menos una figura ejecutada en color. Se proporcionarán copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con figuras en color, después de la solicitud y pago de la tarifa necesaria. Se obtendrá un mejor entendimiento de las características y ventajas de la presente descripción por medio de referencia a la siguiente descripción detallada que

expone aspectos ilustrativos, en los cuales se usan los principios de la descripción, y los dibujos adjuntos (también "Figura" y "Figura" en la presente), de los cuales:

[00071] La figura 1 muestra esquemáticamente una configuración que comprende una cámara apical arriba de una monocapa de células epiteliales y una cámara basal debajo de esta monocapa de células epiteliales. Para la permeabilidad apical a basolateral (por ejemplo, transcitosis), los artículos de prueba (por ejemplo, vehículos, constructos de suministro, cargas útiles, etc.) se aplicaron al lado apical (A) y la cantidad de material permeado (por ejemplo, sometido a transcitosis) se determinó (por ejemplo, usando inmunotransferencia western, cromatografía, etc.) en el lado basolateral (B).

[00072] La figura 2 muestra que un constructo de suministro con SEQ ID NO: 147, que comprende un vehículo (SEQ ID NO: 134) y una carga útil IL-22 (SEQ ID NO: 142), transportaron la carga útil IL-22 a través de las monocapas de células epiteliales intestinales Caco-2, polarizadas, intactas en una manera dependiente de tiempo (la cantidad de proteína en el sitio basolateral se midió 15, 30, y 45 minutos después de que se aplicó el constructo de suministro a la membrana apical de la monocapa como se describe en lo anterior en la figura 1). Los datos muestran además que cuando el constructo de suministro (SEQ ID NO: 147) que comprende el vehículo de

SEQ ID NO: 134 y la carga útil IL-22 de SEQ ID NO: 142 se aplica a células epiteliales Caco-2, aproximadamente 2-3 veces más IL-22 cruzaron la monocapa de células epiteliales Caco-2 como se compara cuando una IL-22 (SEQ ID NO: 143) no acoplada a un vehículo se aplica a células epiteliales Caco-2.

[00073] La figura 3 muestra que un constructo de suministro con SEQ ID NO: 147, que comprende un vehículo (SEQ ID NO: 134) y una carga útil IL-22 (SEQ ID NO: 142), dio por resultado que la carga útil IL-22 se transporte a través de las monocapas de células intestinales SMI-100 intactas y polarizadas en una manera dependiente de tiempo (la cantidad de proteína en la cámara basolateral se midió a 15, 30, y 45 minutos después del que el constructo de suministro se aplicó a la membrana apical de la monocapa). Los datos muestran además que cuando el constructo de suministro que incluye el vehículo de SEQ ID NO: 134 acoplado a la carga útil IL-22 de SEQ ID NO: 142) se aplica a células epiteliales, aproximadamente 2-3 veces más IL-22 cruzó la monocapa de células epiteliales SMI-100 como es comparada cuando una IL-22 (SEQ ID NO: 143) no acoplada a un vehículo se aplica a células epiteliales SMI-100.

[00074] La figura 4 demuestra que un constructo de suministro con SEQ ID NO: 147 da por resultado que IL-22 (SEQ ID NO: 142) se transporte en cantidades significativas a

través del epitelio intestinal intacto y polarizado in vivo. El sitio apical del epitelio intestinal se resalta por la flecha blanca #1. La *lamina propria* se abrevia como "l.p.". La membrana basal exterior del epitelio polarizado se resalta por las flechas blancas #2. La localización de IL-22 se indica por flechas blancas y fluorescencia verde (por ejemplo, flechas blancas #3), la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI.

[00075] La figura 5 muestra que un primer constructo de suministro (SEQ ID NO: 147), y un segundo constructo de suministro (SEQ ID NO: 148) transportaron una carga útil IL-22 a través de las monocapas Caco-2 ("después del transporte" se refiere a la proteína situada en el compartimiento basolateral después del transporte a través de las monocapas Caco-2). Los datos de la inmunotransferencia western muestra además que los constructos de suministro fueron intactos después del transporte, por ejemplo, como se muestra por la ausencia de productos de degradación de peso molecular más bajo. El transporte de la carga útil IL-22 con los constructos de suministro SEQ ID NO: 147 y SEQ ID NO: 148 se muestran con respecto al transporte de una proteína de control IL-22 (SEQ ID NO: 143) en ausencia de un vehículo. IL-22 consistió de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 143.

[00076] La figura 6 muestra la cantidad de un constructo de

suministro (SEQ ID NO: 147) y una IL-22 (SEQ ID NO: 143) detectada en el compartimiento basolateral de las monocapas de células epiteliales Caco-2 después de la transcitosis. Se normalizaron las cantidades de proteínas. Los datos muestran que el transporte de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 147) que incluye un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) a través de las células epiteliales polarizadas fue dependiente de la proteína 75 regulada por glucosa (GRP75, por ejemplo, GRP75B). Las células Caco-2 con silenciamiento de GRP75 (indicado como Caco-2^{GRP75-}) mostró transporte significativamente reducido del constructo de suministro (SEQ ID NO: 147) en comparación con las células que expresan GRP75 (indicado como Caco-2). La dependencia del transporte en GRP75 se indica por la cantidad reducida de constructo de suministro que se detectó en los compartimientos basolaterales en las células de silenciamiento GRP75 como son comparadas con las células que expresan GRP75. El transporte de IL-22 (SEQ ID NO: 143) sola no se afectó por el silenciamiento de GRP75.

[00077] La figura 7 muestra que el transporte de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 147) a través de las células epiteliales polarizadas fue dependiente de la proteína de núcleo de proteoglicano de sulfato de heparan específica de membrana basal (HSPG). Las células Caco-2 con silenciamiento de esta proteína (indicada como Caco-2^{HSPG-})

mostró un transporte significativamente reducido del constructo de suministro (SEQ ID NO: 147) comparadas con las células que expresan HSPG (indicada como Caco-2). La dependencia del transporte en HSPG se indica por la cantidad reducida de constructo de suministro que se detectó en los compartimientos basolaterales en las células de silenciamiento de HSPG en comparación con las células que expresan HSPG. El transporte de IL-22 (SEQ ID NO: 143) sola (es decir, no acoplada a un vehículo) no fue dependiente en HSPG.

[00078] La figura 8 representa la detección microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 154) en los compartimientos apicales (resaltado con la flecha blanca #2) dentro de las células epiteliales 15 min después de la inyección intra-luminal usando un modelo de inyección intra-luminal de rata (flecha blanca #1 resalta la superficie apical, la flecha blanca #3 resalta la membrana basal, y la flecha blanca #4 resalta la *lamina propria*). Los datos muestran que un vehículo derivado de un ejemplo de Cholix$^{41-187}$ (por ejemplo, SEQ ID NO: 137) fue capaz de transportar una carga útil a los compartimientos apicales de las células epiteliales, pero no a través de las células epiteliales. La fluorescencia roja muestra la localización de un vehículo de Cholix, la fluorescencia verde muestra la localización de hGH (SEQ ID NO: 146), y la fluorescencia azul indica la

inmunotransferencia DAPI.

[00079] La figura 9 representa la supresión microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 156) en los compartimentos apicales (resaltados con la flecha blanca #2) de las células epiteliales 15 minutos después de la inyección intraluminal usando un modelo de inyección intraluminal de rata (flecha blanca #1 resalta la superficie apical, flecha blanca #3 resalta la membrana basal, y la flecha blanca #4 resalta la *lamina propria*). Los datos muestran que el vehículo derivado de un ejemplo de Cholix$^{40-205}$ (SEQ ID NO: 138) fue capaz de transportar una carga útil (por ejemplo, hGH) a los compartimientos apicales de las células epiteliales, pero no a través de las células epiteliales en la *lamina propria*. Estos datos sugieren además que los residuos 1-39 de SEQ ID NO: 1 pueden desempeñar una función en la transcitosis pero puede no ser requerida para la endocitosis de un vehículo de Cholix. La fluorescencia roja muestra la localización de un vehículo de Cholix, la fluorescencia verde muestra la localización de hGH (SEQ ID NO: 146), y la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI.

[00080] La figura 8 representa la detección microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 153) en los compartimentos apicales dentro de las células epiteliales 5 minutos después de la inyección intraluminal

del constructo de suministro al yeyuno de rata. En las figuras 10A-10C, la fluorescencia roja muestra la localización de un vehículo de Cholix, la fluorescencia verde muestra la localización de hGH (SEQ ID NO: 146), y la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI; la flecha blanca #1 resalta los compartimentos apicales, y la flecha blanca #2 resalta los compartimentos supranucleares.

[00081] La figura 10B representa la detección microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 153) 10 minutos después de la inyección intraluminal. Los datos muestran que el vehículo transportó la carga útil de hGH de los compartimientos apicales a los compartimientos supranucleares y basales a través del tiempo.

[00082] La figura 10C representa la detección microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 153) 15 minutos después de la inyección intraluminal. Los datos muestran que el vehículo transportó la carga útil de los compartimientos apicales a los compartimientos supranucleares y basales a través del tiempo.

[00083] Las figuras 11A-11B representan el transporte apical a basal de la hormona de crecimiento humana (hGH, SEQ ID NO: 190) sola en comparación con hGH (SEQ ID NO: 146) acoplada a los vehículos. Las longitudes del vehículo se indican por el truncamiento C-terminal con respecto a la referencia SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, “134” indica un

vehículo que tiene los residuos 1-134 de SEQ ID NO: 1). Todos los vehículos incluyeron además una metionina N-terminal). La inmunotransferencia Western para hGH evaluó cualitativamente la capacidad de estas proteínas a someterse al transporte apical a basal a través de las monocapas polarizadas de las células epiteliales intestinales pequeñas humanas primarias in vitro después de 2 horas. Las cantidades de materiales apicalmente aplicados fueron equivalentes sobre una base molar para el contenido de hGH, y se concentraron las recolecciones basales 10 veces antes del análisis.

[00084] La figura 11A muestra una comparación del transporte apical a basal de hGH (SEQ ID NO: 190) solos con respecto aquellos medidos para los constructos de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 151 – SEQ ID NO: 154 y SEQ ID NO: 159 con los truncamientos en las posiciones 134, 151, 187, 41-187, y 266, respectivamente. Los datos muestran que los vehículos de Cholix con los truncamientos C-terminales en las posiciones 134, 151, 187 de SEQ ID NO: 1, o un truncamiento N-terminal en 41 y un truncamiento C-terminal en 187 de SEQ ID NO: 1, mostraron un transporte apical a basal significativamente menor de la hGH conjugada en comparación con el constructo con un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 159) con un truncamiento C-terminal en 266.

[00085] La figura 11B muestra que los constructos de suministro con SEQ ID NO: 155 y SEQ ID NO: 157 - SEQ ID NO:

159 y que incluyen vehículos Cholix con truncamiento C-terminal en las posiciones 206 (SEQ ID NO: 131), 245 (SEQ ID NO: 132), 251 (SEQ ID NO: 133), y 266 (SEQ ID NO: 134), respectivamente, comparadas con SEQ ID NO: 1 mostraron un transporte apical a basal eficiente de la hGH co-unida (SEQ ID NO: 146). Mientras que los vehículos con los truncamientos C-terminales Cholix en las posiciones 245-251 mostraron transporte apical a basal de la hGH co-unida (SEQ ID NO: 146) comparable con aquel del vehículo con el truncamiento C-terminal en la posición 266, el vehículo con un truncamiento C-terminal Cholix en la posición 206 mostró una mejora significativa del transporte apical a basal de hGH en comparación con los vehículos con los truncamientos C-terminales en las posiciones 245, 251, y 266.

[00086] Las figuras 12A-12F muestran el grado del transporte apical a basal a través de las células epiteliales intestinales polarizadas en el yeyuno de rata de seis constructos de suministro, que incluye cada uno un vehículo de Cholix diferente. La localización del vehículo de Cholix (la fluorescencia roja) y hGH (la fluorescencia verde) se muestra por la microscopía de inmunofluorescencia usando los anticuerpos anti-Cholix policlonales y anti-hGH monoclonales, respectivamente. Las flechas blancas indican la membrana apical, “1-p” se refiere, a *lamina propria*, “GC” se refiere a células caliciformes, y las flechas abiertas indican el

constructo de suministro presente en la *lamina propria*.

[00087] La figura 12A muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 151) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 140) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146). La figura 12A muestra que el vehículo no permitió que el constructo de suministro entrará a células epiteliales, sugiriendo que un fragmento de secuencia funcional que tiene residuos de aminoácidos 135-151 de SEQ ID NO: 1 puede desempeñar una función en la endocitosis en células epiteliales polarizadas (en contraste, la figura 12B demuestra que el vehículo con SEQ ID NO: 139 permitió la entrada celular del constructo de suministro respectivo a través de endocitosis).

[00088] La figura 12A muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 152) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 139) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12B muestra que este constructo no entró a células epiteliales (como lo opuesto al constructo con SEQ ID NO: 151 descrito en la figura 12A) pero permaneció principalmente en las acumulaciones vesiculares apicales y, algún grado, en las basales pero no entró a *lamina propria*. permitiendo de esta manera la administración

de la carga útil a los compartimentos apicales y basales de una célula epitelial.

[00089] La figura 12C muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 153) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 136) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12C muestra que este constructo ingresó a células epiteliales, alcanzó los compartimientos apicales y basales, y también alcanzó una región supranuclear de la célula, que aún permaneció dentro de la célula epitelial, sugiriendo que el fragmento de secuencia que consta de los residuos de aminoácidos 152-187 de SEQ ID NO: 1 puede permitir el acceso y administración a las regiones supranucleares, así como permite la localización en los compartimientos basales.

[00090] La figura 12D muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 154) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 137) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12D muestra que este constructo ingresó a células epiteliales pero permaneció en los compartimentos apicales y no pareció que alcanzara los compartimientos basales o supranucleares.

[00091] La figura 12E muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 155) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 131) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12E mostró que este constructo completó el proceso de transcitosis como se indica por los constructos de suministro que alcanzan la *lamina propria* (ver flecha abierta), sugiriendo que el fragmento de secuencia que consta de los residuos de aminoácidos 188-206 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 puede permitir que el vehículo (y los constructos que comprenden este vehículo) se acople con los procesos de reciclaje basales que permiten la liberación del vehículo o constructo respectivo de la célula epitelial en un compartimento basolateral (por ejemplo, *lamina propria*).

[00092] La figura 12F muestra el transporte a través de monocapas epiteliales de yeyuno de rata *in vivo* 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12F muestra que este constructo completó el proceso de transcitosis como se indica por los constructos de suministro que alcanzan la *lamina propria* (ver flecha abierta).

[00093] La figura 13A, y la figura 13B, y la figura 13C muestran que los constructos de suministro con SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 152, y SEQ ID NO: 153, respectivamente, se co-localizaron con Rab11a en el lado apical de Las células epiteliales. Estos datos también muestran que los constructos con SEQ ID NO: 152 y SEQ ID NO: 154 no se localizaron significativamente en el lado basal sino permanecieron principalmente en el lado apical. El constructo con SEQ ID NO: 153 se localizó tanto en el lado apical como basal, sin embargo, sólo se co-localizó con Rab11a en el lado apical y no en el lado basal (sub-imágenes 3a y 3b de la figura 13C). Juntos, estos resultados sugieren que los vehículos que no son capaces de transcitosis pueden entrar a los sistemas de reciclaje apical de la célula epitelial. Las mediciones se llevaron a cabo 15 minutos después de la inyección intraluminal. La fluorescencia verde muestra la localización de hGH, la fluorescencia roja muestra la localización de Rab11a (o Rab11), y la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI (la descripción experimental incluye la figura 13D). 13D).

[00094] La figura 13D muestra que el constructo de suministro con SEQ ID NO: 159 se co-localizó con Rab11a en el lado basal pero no significativamente en el lado apical de la célula epitelial polarizada. Esto sugiere que los vehículos capaces de transcitosis pueden utilizar el sistema de

reciclaje basal para su liberación de la célula epitelial en la *lamina propria* (ver sub-imágenes 4a y 4b de la Figura 13D). 13D).

[00095] Las figuras 14A-14C muestran los efectos de inactivación de D8, HSPG (perlecan), y GRP75, respectivamente, en la función de transcitosis de un constructo de suministro con SEQ ID NO: 150 que incluye un vehículo derivado de Cholix con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 134 acoplado a hGH a través de un espaciador cuya secuencia se expone en SEQ ID NO: 177, en comparación con hGH sola (SEQ ID NO: 190). La línea de células estables de las células Caco-2 que carecen de la expresión de las proteínas candidato específicas K8 (Caco-2^{K8-}), HSPG (Caco-2^{HSPG-}), y GRP75 (Caco-2^{GRP75-}) también se usaron como monocapas *in vitro* para verificar su implicación en la transcitosis del vehículo (por ejemplo, vehículos Cholix) a través de un mecanismo de transportes endógenos activos y selectivos.

[00096] La figura 14A muestra que la inactivación K8 no redujo significativamente la función de transcitosis del constructo de suministro (SEQ ID NO: 150).

[00097] La figura 14B muestra que la inactivación HSPG (perlecan) redujo significativamente la función de transcitosis del constructo de suministro (SEQ ID NO: 150).

[00098] La figura 14C muestra que la inactivación GRP75 redujo significativamente la función de transcitosis del

constructo de suministro (SEQ ID NO: 150).

[00099] La figura 15A muestra las interacciones de unión BiacoreMR usadas para examinar la dependencia de pH de las interacciones de vehículo de Cholix-GRP75. Para ese fin, se acopló la biotina a la C-terminal de la proteína Cholix de longitud completa cuyas secuencias se expone en SEQ ID NO: 1 y se une subsecuentemente a una superficie (por ejemplo, superficie de chip, placa de 96 concavidades de plástico, etc.) usando la bioconjugación de biotina-estreptavidina y se incubó con la proteína GRP75 purificada en soluciones amortiguadoras a pH 5,5, 6,5, y 7,5, respectivamente. La afinidad de unión más alta fue para esta interacción que se midió en pH 6,5.

[000100] La figura 15B muestra la dependencia de pH de la interacción de un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 189, la secuencia de Cholix de longitud completa de SEQ ID NO: 1 con supresión del residuo de ácido glutámico en la posición 581) con el receptor apical (por ejemplo, TMEM132 tal como TMEM132A), los receptores de evitación de lisosomas (por ejemplo, GRP75), receptor de tráfico (por ejemplo, ERGIC-53), y receptor basal (por ejemplo, perlecan). Esta dependencia de pH de la interacción del receptor como es determinada en los ensayos de resonancia de plasmones indica que un vehículo derivado de Cholix puede interactuar con ciertos receptores secuencialmente dependientes de su

ubicación. Por ejemplo, estos datos muestran que un vehículo derivado de Cholix tiene una afinidad significativamente más alta a la endocitosis y receptores de tráfico tempranos tal como receptor de entrada apical y receptor de evitación de lisosomas en pH 7,5. Una vez que el pH desciende a aproximadamente 5,5, la afinidad del vehículo de Cholix para estos receptores de tráfico temprano disminuye, mientras que su afinidad para su receptor de tráfico apical-basal ERGIC-53 y la proteína de liberación basal perlecan se incrementa significativamente en ese pH, permitiendo que el vehículo de Cholix, "se dé" a los receptores de liberación de tráfico y basales durante el proceso de transcitosis vesicular.

[000101] La figura 16 muestra las interacciones de unión BiacoreMR significativas de la proteína Cholix de longitud completa con la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 1 con el perlecan y GRP75.

[000102] La figura 17 muestra las interacciones de unión BiacoreMR significativas de la proteína Cholix de longitud completa con la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 1 con GRP75, perlecan, y TMEM132A.

[000103] Las figuras 18A-18D muestran el destino de la hormona de crecimiento humana (hGH, SEQ ID NO: 190) que se suministró por inyección intraluminal (ILI, la superficie luminal se indica como una flecha blanca en la figura 18A-figura 18F) en el yeyuno de rata in vivo se evaluó primero

como un transporte expectante de control negativo a los lisosomas después de la captación celular.

[000104] La figura 18A muestra que la localización de hGH (SEQ ID NO: 190) 15 minutos pos-inyección (ILI) se limitó a una población pequeña de vesículas en la región apical de las células epiteliales como es mostrado por la detección de inmunofluorescencia verde.

[000105] La figura 18B, la figura 18C, y la figura muestran que 15 min pos-ILI, hGH (SEQ ID NO: 190) se co-localizó con la proteína de membrana lisosomal-asociada 1 (LAMP1, la fluorescencia roja) (Figura 18B) y proteína relacionada a Ras (Rab7, fluorescencia púrpura) (Figura 18C) con aproximadamente la misma frecuencia y características de los lisosomas LAMP1+, Rab7+ residentes (Figura 18D), indicando que la hGH se dirigió a la ruta destructiva lisosomal (por ejemplo, reciclaje) poco después de la captación en las células epiteliales.

[000106] La figura 18E y la figura 18F muestran que un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que incluye un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) a través de un espaciador (SEQ ID NO: 175), se dirigió lejos de la ruta lisosomas y de esta manera no mostró la co-localización con ya sea LAMP1 (Figura 18E) o Rab7 (Figura 18F), permitiendo de esta manera la transcitosis de la carga útil funcional a través de las células

epiteliales polarizadas en la *lamina propria*.

[000107] La figura 19A muestra que la distribución de la proteína de recubrimiento I (COPI, la fluorescencia roja) se restringió a la membrana apical luminal y el compartimiento vesicular apical a células epiteliales antes de la inyección luminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que incluye un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) mediante un espaciador (SEQ ID NO: 175). En comparación, después de la inyección intraluminal apical (ILI, la superficie luminal se indica como una flecha blanca en Figura 19A-Figura 19D) del constructo de suministro (SEQ ID NO: 159), la Figura 19B muestra que COPI se re-distribuyó a una ubicación supra-nuclear, indicando la co-localización de las vesículas que contienen tanto el constructo de suministro con SEQ ID NO: 159 como COPI. La fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI. Las mediciones en Figuras 19A-19D se llevaron a cabo 15 minutos pos-ILI.

[000108] La figura 19C muestra que LMAN1 (la fluorescencia verde) se co-localizó con COPI (la fluorescencia roja) en una región apical (resaltada por la flecha blanca) de las células epiteliales polarizadas antes de la inyección de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159).

[000109] La figura 19D muestra que, después de la ILI apical (resaltada por la flecha blanca) del constructo de suministro

(SEQ ID NO: 159), LMAN1 interactuó y se distribuyó con el constructo de suministro a la región basal de la célula epitelial, que esta adyacente a la *lamina propria* (indicada como "l-p"). De esta manera, un mecanismo de redistribución LMAN1 parece que se usa por los vehículos Cholix para moverse de lado apical de la célula epitelial a un compartimiento basal.

[000110] Las figuras muestran el tráfico de un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) de los compartimentos apicales (indicados por la flecha blanca #1) a basales (indicados por la flecha blanca #2) en las células epiteliales 5 (Figura 19F), 10 (Figura 19G), y 15 min (Figura 19H) después de la inyección luminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que comprende un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a una hGH (SEQ ID NO: 146) en el yeyuno de rata. La localización del vehículo de Cholix se muestra por fluorescencia verde, la localización del receptor ERGIC se muestra por fluorescencia roja, y la localización de otro marcador de ERGIC que puede desempeñar una función en el tráfico apical a basal (también referido en la presente como complejo de proteína de tráfico ER-Golgi) se muestra por la fluorescencia púrpura; de esta manera la interacción del vehículo de Cholix y el receptor ERGIC se muestra por fluorescencia amarilla, la interacción del vehículo de Cholix y el complejo de proteína de tráfico ER-Golgi se muestra por

fluorescencia rosa, y la interacción y/o co-localización del vehículo de Cholix, receptor ERGIC, y el complejo de proteína de tráfico ER-Golgi se muestra por puntos blancos (superposición de fluorescencia verde, roja, y púrpura). La inmunotransferencia DAPI se indica por la fluorescencia azul. La inmunotransferencia DAPI se indica por fluorescencia azul.

[000111] La figura 19E muestra células epiteliales intestinales polarizadas no tratadas.

[000112] La figura 19F muestra localización e interacción del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) con el complejo de tráfico ER-Golgi 5 minutos después de la inyección luminal en el compartimiento apical como se indica por la señal de fluorescencia rosa en los compartimientos apicales.

[000113] La figura 19G muestra el tráfico del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) en asociación con ERGIG-53 a la membrana basal 10 minutos después de la inyección luminal seguido por la liberación basal del vehículo (y constructo) en la *lamina propria* (flecha dorada). Estos datos muestran que un vehículo derivado de Cholix puede usar interacciones específicas con las proteína ERGIC (por ejemplo, ERGIC-53) para “secuestrar” el tráfico vesicular de los compartimientos apicales a basales de una célula epitelial polarizada.

[000114] La figura 19H muestra las cantidades incrementadas del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) presente en la *lamina propria* 15 minutos después de la inyección luminal.

[000115] Las figuras 19I-19K muestran que un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) usó los mecanismos de secreción de proteínas basales para traficar a través de una célula epitelial polarizada en la *lamina propria*. Las imágenes de microscopia de fluorescencia se adquirieron 15 minutos después de la inyección luminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que comprende un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a una hGH (SEQ ID NO: 146) en el yeyuno de rata, y muestran que las vesículas basales (resaltadas por círculos blancos y los números "13" en diferentes células epiteliales) pueden contener el vehículo de Cholix y el receptor ERGIC-53, el vehículo de Cholix y la proteína de secreción basal, o los tres del vehículo de Cholix, receptor ERGIC, y la proteína de secreción basal. La localización del vehículo de Cholix se muestra por fluorescencia verde (usando un anticuerpo vehículo anti-Cholix), la localización del receptor ERGIC-53 se muestra por fluorescencia roja, y la localización de la proteína de secreción basal se muestra por fluorescencia púrpura; de esta manera la interacción del vehículo de Cholix y el receptor ERGIC-53 se muestra por fluorescencia amarilla, la interacción del vehículo de Cholix y la proteína de sección basal perlecan se muestra por fluorescencia rosa, y la interacción y/o co-localización del vehículo de Cholix, receptor ERGIC-53, y perlecan se muestra por puntos blancos

(superposición de fluorescencia verde, roja, y púrpura). La inmunotransferencia DAPI se indica por fluorescencia azul.

[000116] La figura 19I muestra que las vesículas de compartimiento basal contuvieron el vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) y el receptor ERGIC-53 como se indica por la fluorescencia amarilla.

[000117] La figura 19J muestra que las vesículas de compartimiento basal contuvieron el vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) y el perlecan como se indica por la fluorescencia rosa.

[000118] La figura 19K muestra que las vesículas de compartimiento basal contuvieron el vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134), receptor ERGIC-53, y perlecan como se indica por puntos blancos (por ejemplo, superposición de fluorescencia verde, roja y púrpura).

[000119] La figura 20A muestra la distribución de otro elemento de compartimiento intermedio del retículo-Golgi endoplásmico (ERGIC), SEC22b, en ausencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159). En los tejidos no tratados (es decir, sin inyección de un constructo de suministro), SEC22b y LMAN1 se co-localizan extensivamente en el compartimiento apical mientras el LMAN1 se observó solo separadamente cercano a la membrana plasmática apical. En las figuras 20A-20D, la fluorescencia roja muestra la localización de LMAN1, la fluorescencia púrpura muestra la localización de SEC22b,

la fluorescencia verde muestra localización de hGH, la flecha blanca indica la superficie apical, y "G" indica células Caliciformes.

[000120] La figura 20B muestra que 5 minutos después de ILI de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146), LMAN1, SEC22b, y hGH se co-localizaron en el compartimiento apical pero no significativamente en los compartimientos basales de las células epiteliales.

[000121] La figura 20C muestra que 10 minutos post ILI, el constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) y LMAN1 se observaron que se co-localizan en el compartimiento basal de las células epiteliales sin SEC22b, confirmando que LMAN1 interactúa y se movió con el constructo de suministro dentro de la vesícula del compartimiento vesicular apical basal de las células epiteliales.

[000122] La figura 20D muestra que el grado del constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) y la co-localización de LMAN1ing en el compartimiento basal 15 min pos-ILI se había incrementado, con una cantidad de incremento de hGH que alcanza la *lamina propria* a través del tiempo.

[000123] La figura 20E, la figura 20H muestran las mismas secciones de tejido como se describe en lo anterior y se muestran en la Figura 20A-Figura 20D pero que muestran solo las señales LMAN1 y SEC22b (no la señal hGH). Esto muestra la

profunda redistribución de LMAN1 al compartimiento basal sin una redistribución de SEC22b en respuesta a la aplicación apical de una administración (SEQ ID NO: 159). Estos datos muestran que los constructos de suministro que comprenden un vehículo derivado de Cholix pueden usar rutas de tráfico Cholix endógenas que permiten el transporte rápido y eficiente de la carga útil a través del epitelio intestinal al acoplar esta carga útil al vehículo.

[000124] Las figuras 21A-21E muestran un modelo de superficie ejemplar de un vehículo derivado de Cholix que consta de SEQ ID NO: 178 (incluye los residuos de aminoácidos 1-265 de SEQ ID NO: 1 y una metionina N-terminal) que se usó para resaltar las regiones seleccionadas de interés que pueden desempeñar una función en ciertas funcionalidades relacionadas con la transcitosis apical basal, así como su posición relativa y proximidad en la superficie de la proteína. Las regiones de aminoácidos situadas dentro de los residuos V^{1} y E^{39} son adyacentes a los aminoácidos expuestos en la superficie D^{150}-K^{186} y K^{186}-L^{205}. Específicamente, L^{17}-I^{25} (región X1, SEQ ID NO: 160) y T^{170}-I^{176} (región X2, SEQ ID NO: 161) se coordinan para formar una bolsa rodeada por varias cargas negativas. Similarmente, K^{186}-H^{202} (región X3, SEQ ID NO: 162) se coordina con I^{31}-E^{39} (región X4, SEQ ID NO: 163) para formar una estructura de puente continua. Además, el modelo de superficie muestra residuos D^{135}-N^{139} (región X5, SEQ

ID NO: 164), y los residuos de asparagina (por ejemplo, sitios de glicosilación potenciales) resaltados en púrpura.

[000125] La figura 21A muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de Cholix con SEQ ID NO: 178.

[000126] La figura 21B muestra la localización de las regiones X1, X3 y X4.

[000127] La figura 21C muestra la localización de las regiones X1 y X2, así como X3 y X4.

[000128] La figura 21D muestra la localización de las regiones X1, X2, X4 y X5.

[000129] La figura 21E muestra la ubicación de las regiones X1, X2, X3, X4 y X5.

[000130] Las figuras 22A-22L ilustran un análisis de ruta de tráfico para un constructo de suministro derivado (SEQ ID NO: 149). El constructo de suministro comprendió un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 135) acoplado a una forma secreta, activa de IL-10 (SEQ ID NO: 145) a través de un espaciador de glicina-serina (SEQ ID NO: 176). En las figuras 22A-22L la flecha blanca #1 resalta la superficie apical, la flecha blanca #2 resalta la superficie basal, y la flecha blanca #3 resalta la *lamina propria*.

[000131] La figura 22A muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado en gran medida con el antígeno EEA1 en las ubicaciones celulares consistente con el tráfico en ambos compartimientos apicales y basales de las

células epiteliales, sugiriendo que la presencia del constructo de suministro derivado de Cholix en los compartimientos de endosomas tempranos. La fluorescencia roja muestra la localización del antígeno EEA1, y la fluorescencia verde muestra la localización de IL-10.

[000132] La figura 22B muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado en gran medida con Rab7 (izquierda superior) predominantemente en el compartimiento apical de las células epiteliales, pero con solo co-localización limitada en las células dentro de la *lamina propria*, sugiriendo la presencia del constructo de suministro derivado de Cholix en los compartimientos de endosoma tardíos (izquierda de fondo muestra la imagen de luz blanca, y la derecha de fondo muestra la inmunotransferencia fusionada con la inmunotransferencia DAPI que se muestra en azul, la fluorescencia roja que muestra la localización del antígeno EEA1, y la fluorescencia verde que muestra la localización de IL-10).

[000133] La figura 22C muestra que LAMP1 se identificó en las vesículas específicas, grandes consistentes con los lisosomas maduras que estuvieron desprovistos del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) (flechas blancas, la fluorescencia roja que muestra la localización del antígeno EEA1, y la fluorescencia verde que muestra la localización de IL-10). El constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-

localizado, sin embargo, con el antígeno LAMP1 en las ubicaciones celulares diferentes a las estructuras similar a lisosoma, consistentes con el tráfico de vesículas en ambos de los compartimientos apicales y basales de las células epiteliales, sugiriendo la presencia del constructo de suministro derivado de Cholix en los compartimientos endosomales tardíos.

[000134] La figura 22D muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado también en gran medida con las vesículas recubiertas con clatrina, particularmente en las áreas adyacentes al núcleo, y con Rab11a predominantemente en el compartimiento basal de células epiteliales así como en las células seleccionadas dentro de la lamina propria. La inmunotransferencia DAPI s muestra en azul, la fluorescencia roja muestra la localización del antígeno IL-10, y la fluorescencia verde muestra la localización de clatrina.

[000135] La figura 22E muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado con el retículo endoplásmico como es mostrado por la calnexina (la fluorescencia roja que muestra la localización de la calnexina, y la fluorescencia verde que muestra la localización de IL-10) en un patrón adyacente al núcleo en las células epiteliales y en la fracción grande de las células dentro de la *lamina propria*. Específicamente, el

constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado en gran medida con el compartimento intermedio de Golgi de retículo endoplasmático (ERGIC) y el antígeno LMAN1 que pareció que se re-distribuye en respuesta a la endocitosis y transcitosis del vehículo, como se muestra durante 5 (figura 22F), 10 (figura 22G), y 15 minutos después de la inyección (figura 22H).

[000136] La figura 22F muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado en gran medida con el compartimiento de intermedio de Golgi de retículo endoplásmico 53 (ERGIC-53) y el antígeno LMAN1 (la fluorescencia roja que muestra la localización de ERGIC-53 y LMAN1, y la fluorescencia verde que muestra la localización de IL-10, la fluorescencia azul que muestra la inmunotransferencia DAPI) pareció que se redistribuye en respuesta a la endocitosis y transcitosis del vehículo, como se muestra durante 5 minuto después de la inyección.

[000137] La figura 22G muestra el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado con el antígeno LMAN1 10 minutos después de la inyección. Los datos muestran la localización significativa del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) en la *lamina propria*.

[000138] La figura 22H muestra el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado con el antígeno LMAN1 15 minutos después de la inyección. Los datos muestran la

localización significativa del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) en la *lamina propria*.

[000139] La figura 22I muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) no se co-localizó con los niveles bajos de giantina presentes en las células epiteliales (la fluorescencia roja muestra la localización de IL-10, y la fluorescencia verde muestra la localización de giantina, la fluorescencia azul muestra la inmunotransferencia DAPI). Alguna giantina se co-localizó con el constructo en un subconjunto de células presentes en la *lamina propria*, sugiriendo que el vehículo derivado de Cholix no se localiza con el compartimiento de Golgi.

[000140] La figura 22J muestra que el antígeno 58K se localizó en las células epiteliales en un sitio apical al núcleo y el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) se mostró alguna co-localización (la fluorescencia roja muestra la localización de IL-10, y la fluorescencia verde muestra la localización del antígeno de Golgi 58K, la fluorescencia azul muestra la inmunotransferencia DAPI) con su proteína en una manera que sugiere un leve movimiento a través de este compartimiento. No se observó el antígeno 58K en las células dentro de la *lamina propria*.

[000141] La figura 22I muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149, izquierda superior, la localización IL-10) mostró algún nivel de co-localización con

el antígeno TGN38 (derecha superior), que mostró una distribución celular que se restringió al lado apical de los núcleos en las células epiteliales y adyacente al núcleo en algunas células dentro de la lamina propria. La imagen izquierda de fondo muestra una imagen de luz blanca y la derecha de fondo muestra una fusión (superposición) con IL-10 (rojo), TGN38 (verde), y la señal DAPI (fluorescencia azul).

[000142] La figura 22L muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) (la localización IL-10 mostrada por la fluorescencia verde, derecha superior) se co-localiza en gran medida con Rab11a (izquierda superior, la localización mostrada por la fluorescencia roja) predominantemente en el compartimiento basal de las células epiteliales y en las células seleccionadas dentro de la lamina propria. La imagen a la izquierda de fondo muestra una imagen de luz blanca y la derecha de fondo muestra una fusión (superposición) con IL-10 (verde), Rab11a (rojo), y señal DAPI (fluorescencia azul).

[000143] Las figuras 23A-23C muestran imágenes de microscopia que muestran la transcitosis de una IL-10 a través de células epiteliales intestinales polarizadas en ratas Wistar en varios puntos de tiempo después de la aplicación luminal del constructo de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 al yeyuno de rata. El constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) incluyó un vehículo

con SEQ ID NO: 135 acoplado a una carga útil de IL-10 que tiene los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO: 145 a través de un espaciador que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 176. La fluorescencia verde indica la presencia de IL-10 (a través de la inmunotransferencia con un anticuerpo anti-IL-10). La fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI, que etiqueta el ADN, y la fluorescencia roja indica la presencia de CK-8 (intercelucina-8) con lo cual un vehículo derivado de Cholix se puede co-localizar (por ejemplo, en una región supranuclear de una célula epitelial) durante la transcitosis. Las flechas blancas #1 resaltan la membrana apical de las células epiteliales, y las flechas blancas #2 resaltan la membrana basal de las células epiteliales.

[000144] La figura 23A muestra el grado de transcitosis de IL-10 un minuto después de la aplicación luminal del constructo de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 al yeyuno de rata. Los datos muestran que el transporte de una carga útil de IL-10 del sitio apical al basal y en la *lamina propria* se presentó tan temprano como 1 minuto después de la aplicación del constructo de suministro. La flecha blanca #3 indica la presencia de IL-10 en la *lamina propria* (ver por ejemplo, flechas blancas #3).

[000145] La figura 23B muestra el grado de transcitosis de IL-10 cinco minutos después de la aplicación luminal del

constructo de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 al yeyuno de rata. Los datos muestran una cantidad incrementada de carga útil de IL-10 transportada que estuvo presente en la *lamina propria* (ver por ejemplo, flechas blancas #3) 5 minutos después de la aplicación luminal del constructo de suministro.

[000146] La figura 23C muestra el grado de transcitosis de IL-10 diez minutos después de la aplicación luminal del constructo de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 al yeyuno de rata. Los datos muestran una cantidad aún más alta de carga útil de IL-10 transportada que estuvo presente en la *lamina propria* (ver por ejemplo, flechas blancas #3) 10 minutos después de la aplicación luminal del constructo de suministro.

[000147] Las figuras 23D-23F muestran la endocitosis apical y el tráfico temprano del vehículo de Cholix con SEQ ID NO: 135 en las células epiteliales 1 min después de la inyección luminal del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) que comprende el vehículo de Cholix con SEQ ID NO: 135 acoplado a una IL-10 (SEQ ID NO: 145) en el yeyuno de rata. Los datos muestran que los vehículos derivados de Cholix evitan la ruta de destrucción lisosomal al interactuar con los receptores de evitación lisosomal. La localización del vehículo de Cholix se muestra por la fluorescencia verde, la localización del receptor de entrada apical TMEM132 se muestra por

fluorescencia roja; y la localización de los receptores de evitación de lisosoma se muestran por fluorescencia púrpura; de esta manera la interacción del vehículo de Cholix y el receptor de entrada apical TMEM132 se muestran por fluorescencia amarilla, la interacción del vehículo de Cholix y el receptor de evitación de lisosoma se muestra por fluorescencia rosa, y la interacción y/o co-localización del vehículo de Cholix, receptor de entrada apical TMEM132, y receptor de evitación de lisosoma se muestran por puntos blancos (superposición de fluorescencia verde, roja y púrpura). La inmunotransferencia DAPI se indica por fluorescencia azul.

[000148] La figura 23D muestra la localización del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) en la membrana apical (indicada por la flecha blanca #1) de una célula epitelial polarizada. La membrana basal se indica por la flecha blanca #2 y la *lamina propria* se indica por la flecha blanca #3.

[000149] La figura 23E muestra la interacción del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) con el receptor de entrada apical TMEM132 como se indica por la fluorescencia amarilla en y alrededor de la membrana apical.

[000150] La figura 23F muestra que el vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135), el receptor de entrada apical TMEM132, y el receptor de evitación de lisosoma están en proximidad cercana en la membrana apical como se muestra por los puntos blancos

(por ejemplo, superposición de fluorescencia verde, roja y púrpura) indica por la flecha blanca. Se asume que el receptor de evitación de lisosoma (GRP75) puede aproximarse a un complejo de receptor de entrada apical-vehículo de Cholix, seguido por la disociación del vehículo de Cholix con el receptor de entrada apical TMEM132 y la asociación del vehículo de Cholix con el receptor de evitación de lisosoma GRP75 debido a los cambios en el entorno de pH y la dependencia de pH de esta interacción de vehículo de Cholix-receptor como se muestra, por ejemplo, en la figura 15B. 15B.

[000151] Las figuras 23G-23H muestran el tráfico de un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) de los compartimientos apicales a supranucleares en la células epiteliales 5 y 15 min después de la inyección luminal del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) que comprende un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 135) acoplado a una IL-10 (SEQ ID NO: 145) en el yeyuno de rata. La localización del vehículo de Cholix se muestra por fluorescencia verde, la localización del receptor ERGIC se muestra por fluorescencia roja, la localización del receptor de entrada apical (por ejemplo, TMEM132) se muestra por fluorescencia naranja; y la localización de los receptores de evitación de lisosoma se muestra por fluorescencia púrpura; de esta manera la interacción del vehículo de Cholix y el receptor ERGIC se muestra por fluorescencia amarilla, la interacción del

vehículo de Cholix y el receptor de evitación de lisosomas se muestra por fluorescencia rosa, y la interacción y/o co-localización del vehículo de Cholix, el receptor de entrada apical, y el receptor de evitación de lisosoma se muestra por puntos blancos (superposición de fluorescencia verde, roja y púrpura). La inmunotransferencia DAPI se indica por fluorescencia azul.

[000152] La figura 23G muestra la localización del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) en una célula epitelial intestinal polarizada 5 minutos después de la inyección luminal del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149). Los datos muestran que, después de la endocitosis mediada por receptor apical, el vehículo de Cholix forma complejos con un receptor de evitación de lisosoma y el receptor de entrada apical cercana a la membrana apical (indicada por manchas blancas (superposición de fluorescencia verde, roja y púrpura) y resaltada por la flecha blanca) y también comienza interactuar con el receptor ERGIC como es mostrado por la fluorescencia amarilla (y la flecha amarilla) ligeramente más cercana a las regiones supranucleares dentro de la célula.

[000153] La figura 23H muestra la localización del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) en una célula epitelial intestinal polarizada 15 minutos después de la inyección luminal del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149). Los datos muestran que el vehículo se movió de los compartimientos apicales a

supranucleares mientras que se asoció con ERGIC (ver flecha amarilla), en donde la intensidad de fluorescencia amarilla se incrementa en comparación con 5 minutos pos-inyección, indicando el movimiento del vehículo de Cholix incrementado de las regiones apicales a supranucleares a través del tiempo. Los datos muestran además la localización del vehículo de Cholix en la membrana basal y en la *lamina propria* (flechas doradas).

[000154] La figura 24 muestra un diagrama de los elementos de compartimiento intracelular (por ejemplo, regiones celulares, compartimientos, y receptores tal como socios de interacción de receptor de transporte (o TRIP) de vehículos) implicados en la transcitosis apical a basal de los vehículos descritos en la presente. El proceso de transcitosis se describe esquemáticamente durante un transcurso de tiempo de 15-minutos. Por ejemplo, los vehículos derivados de Cholix capaces de transcitosis no pueden o no pueden entras significativamente en los lisosomas o las rutas de reciclaje apicales después de la endocitosis (por ejemplo, como es representado por los endosomas de reciclaje o "RE"). La redistribución de COPI y LMAN1, pero no SEC22b, después de la aplicación apical de un vehículo derivado de Cholix, así como el acceso a las rutas de reciclaje de compartimiento basal se muestran como características de ruta de los vehículos derivados de Cholix. De esta manera, los vehículos derivados

de Cholix descritos en la presente pueden usar una serie de compartimientos vesiculares intracelulares para pasar a través de las células epiteliales intestinales polarizadas que pueden culminar en la transcitosis apical a basal y permitir que estos vehículos lancen rápida y de manera eficaz (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 20%, 25%, o 50% de material aplicado a la superficie apical) a la carga útil (por ejemplo, proteínas terapéuticas) en la *lamina propria*.

[000155] La figura 25 muestra que tanto un vehículo derivado de Cholix^{386} (por ejemplo, SEQ ID NO: 135 o 180) y un vehículo derivado de Cholix^{415} (por ejemplo, que comprende los residuos 1415 def SEQ ID NO: 1) transportan un agente anti-TNFα (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNFα o fragmento funcional del mismo) a través de las células epiteliales intestinales a 10 minutos y a 40 minutos. Por otra parte, un constructo Cholix^{386}-anti-TNFα se transporta aproximadamente 12x la velocidad del anti-TNF-α solo y un Cholix^{415}-anti-TNFα se transporta a ~7x de la velocidad del anti-TNF-α solo.

[000156] La figura 26 muestra la pureza de SEQ ID NO: 192-Exenatida (SEQ ID NO: 192 reticulada a Exenatida (SEQ ID NO: 195)) que se ejecuta en un gel de SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie.

[000157] La figura 27 muestra la transcitosis *in vivo* de la Exenatida reticulada a los vehículos SEQ ID NO: 191 o la SEQ ID NO: 192 a través del yeyuno de ratas Sprague Dawley. La

cantidad (en pM) de la Exenatida transportada a través de los tejidos intestinales se midió en 10 minutos y 40 minutos post-tratamiento. Los datos muestran que tanto SEQ ID NO: 191-Exenatida como SEQ ID NO: 192-Exenatida son capaces de transportarse en una velocidad más alta que Exenatida sola en 10 minutos y en 40 minutos.

[000158] La figura 28A muestra que la longitud de los espaciadores de aminoácidos con SEQ ID NO: 175, 196 y 197 no impactó a la capacidad de IL-22 (NO de SEQ ID: 142) cuando se incluye en los constructos de suministro con SEQ ID NO: 147, 198 y 199 para inducir la dimerización de receptor de IL-22. La inducción de la dimerización de receptor de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22, SEQ ID NO: 143) se muestra en la curva negra.

[000159] La figura 28B muestra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 142) al extremo N o al extremo C del vehículo que comprende residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 mediante el espaciador con SEQ ID NO: 196 no cambió significativamente la capacidad de los constructos de suministro SEQ ID NO: 198, 200 y 201 para inducir la dimerización de receptor de IL-22. La inducción de la dimerización de receptor de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22) se muestra en la curva negra.

[000160] La figura 28C muestra que la longitud de los espaciadores de aminoácidos con SEQ ID NO: 175, 196 y 197 no

impactó a la capacidad de IL-22 (NO de SEQ ID: 142) cuando se incluye en los constructos de suministro con SEQ ID NO: 147, 198 y 199 para inducir la activación de pSTAT3. La activación de pSTAT3 de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22, SEQ ID NO: 143) se muestra en la curva negra.

[000161] La figura 28D muestra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 142) al extremo N o al extremo C del vehículo que comprende residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 mediante el espaciador con SEQ ID NO: 196 no cambió significativamente la capacidad de los constructos de suministro SEQ ID NO: 198, 200 y 201 para inducir la activación de pSTAT3. La activación de pSTAT3 de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22) se muestra en la curva negra.

Descripción Detallada de la Invención

I. Introducción

[000162] Se proporcionan en la presente, en ciertas modalidades, constructos de suministro (por ejemplo, complejo de vehículo-carga útil) capaces de transportar una o más moléculas de carga útil heterólogas (por ejemplo, una o más cargas útiles terapéuticas) a células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales intestinales polarizadas), por ejemplo, por endocitosis, o a través de células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales intestinales polarizadas), por ejemplo, por transcitosis. Los constructos de suministro

pueden comprender un vehículo que está acoplado a la carga útil heteróloga. El vehículo puede ser capaz de transportar la carga útil heteróloga a, o a través de, células epiteliales usando rutas de tráfico endógenos. La utilización de las rutas de tráfico endógeno, como lo opuesto al uso de difusión pasiva, puede permitir que el vehículo lance la carga útil heteróloga rápidamente (por ejemplo, al menos 10^{-6} cm/seg, 10^{-5} cm/seg) y de manera eficiente (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 20%, 25%, o 50% de material aplicado a la superficie apical) a, o a través de, las células epiteliales sin deteriorar la función de barrera de estas células o la actividad biológica de la carga útil heteróloga.

II. Vehículos

[000163] La porción de vehículo de un constructo de suministro proporcionada en la presente puede ser cualquier molécula (por ejemplo, molécula pequeña, polipéptido, ácido nucleico, etc.) capaz de incrementar la velocidad y/o cantidad de una carga útil heteróloga (por ejemplo, una carga útil terapéutica) administrada en y/o a través de un epitelio.

[000164] Un vehículo en la presente puede tener numerosos atributos. En algunas modalidades, un vehículo en la presente puede tener una activación de ribosilación ADP reducida (por ejemplo, al menos 50% reducida) o extirpada (por ejemplo, ribosilación del factor de alargamiento 2) con respecto a un

polipéptido de Cholix de origen natural tal como SEQ ID NO: 3.

[000165] En algunas modalidades, un vehículo en la presente usa una ruta de tráfico endógeno para transportar una carga útil heteróloga acoplada al mismo a través de una célula epitelial polarizada. Este vehículo puede ser referido en la presente como un vehículo de transcitosis. En algunos casos, un vehículo en la presente puede usar una ruta de tráfico endógeno para transportar una carga útil heteróloga acoplada al mismo en una célula epitelial polarizada. Este vehículo puede ser referido en la presente como un vehículo de endocitosis. Dentro de los vehículos de endocitosis, puede haber vehículos que administran una carga útil acoplada a los mismos en las regiones específicas dentro de las células epiteliales polarizadas tal como un compartimiento apical, un compartimiento supranuclear, o un compartimiento basal.

[000166] Cualquiera de los vehículos en la presente puede transportar moléculas acopladas a los mismos al interactuar y/o al co-localizarse con una o más proteínas endógenas de este epitelio. La una o más proteínas endógenas pueden ser receptores o enzimas capaces de mover un vehículo en o a través de la célula epitelial. La interacción y/o co-localización con la una o más proteínas endógenas de la célula epitelial pueden proporcionar un vehículo con una o más funciones, incluyendo endocitosis en la célula epitelial,

evitación de una ruta de destrucción lisosomal, tráfico de un compartimiento apical a un compartimiento basal, y/o exocitosis de la membrana basal de la célula epitelial en un compartimiento de la submucosa tal como la *lamina propria*.

[000167] Una interacción de este vehículo con una proteína endógena puede ser una interacción selectiva. Esta interacción selectiva puede ser una interacción dependiente de pH. En casos donde un vehículo interactúa con dos o más proteínas endógenas, estas interacciones pueden ser interacciones secuenciales donde una primera proteína de interacción entrega el vehículo a una segunda proteína de interacción. Estas interacciones secuenciales pueden presentarse en un pH diferente (por ejemplo, pH 5,5, 7,0, 7,5, etc.). Una interacción entre un vehículo y una proteína endógena puede ser una interacción covalente o no covalente. Las interacciones no covalentes incluyen en unión de hidrógeno, interacciones de van der Waals, uniones iónicas, interacciones π-π, etc.

[000168] En algunos casos, una de las proteínas endógenas con las que un vehículo puede interactuar puede ser un receptor de entrada apical. Este receptor de entrada apical puede ser una proteína transmembrana 132 (TMEM132). La interacción de un vehículo con este receptor de entrada apical puede permitir que el vehículo entre a la célula epitelial a través de la endocitosis mediada por receptor.

[000169] Un vehículo también puede interactuar con un receptor de evitación de lisosomas. Esta interacción con un receptor de evitación de lisosomas puede presentar dentro de la célula epitelial y subsecuente a la endocitosis. Un receptor de evitación de lisosomas puede ser una proteína 75 regulada con glucosa (GRP75, por ejemplo, GRP75B). La interacción de un vehículo con este receptor de evitación de lisosomas puede permitir que el receptor evite o eluda la degradación lisosomal. Esta capacidad puede permitir que un vehículo reduzca significativamente la cantidad de carga útil acoplada al vehículo que alcanza un lisosoma de una célula, un destino que más proteínas terapéuticas se enfrentan una vez que son captadas por el epitelio intestinal.

[000170] Además, un vehículo puede interactuar con una proteína de tráfico apical a basal. Esta interacción se puede presentar dentro de la célula epitelial y subsecuente a la endocitosis. Esta proteína de tráfico apical a basal puede ser una proteína de compartimiento intermedio de Golgi de retículo endoplásmico (ERGIC), tal como ERGIC-53. La interacción de un vehículo con una proteína ERGIC puede permitir que el vehículo se mueva de un compartimiento apical a un compartimiento supranuclear o un compartimiento basal.

[000171] Un vehículo de transcitosis también puede interactuar con una proteína de liberación basal capaz de promover la exocitosis de un vehículo de un sitio basal de

una célula epitelial. Esta interacción se puede presentar en el sitio basal de una célula epitelial y subsecuente al movimiento de un compartimiento apical a un compartimiento basal. Esta proteína de liberación basal puede ser perlecan (también referida en la presente como proteína de núcleo de proteoglicano de sulfato de heparan específica de membrana basal o HSPG). La interacción de un vehículo con perlecan puede permitir que el vehículo acceda a un sistema de reciclaje basal que permite la liberación del vehículo del compartimiento basal en un compartimiento de la submucosa tal como la *lamina propria*.

[000172] De esta manera, un portado de transcitosis en la presente puede ser una molécula que es capaz de interactuar con las proteínas endógenas TMEM132 (por ejemplo, TMEM132A), GRP75 (por ejemplo, GRP75B), ERGIC (por ejemplo, ERGIC-53), y perlecan (HSPG), permitiendo que este vehículo transporte una molécula de carga útil acoplada al mismo a través de un epitelio polarizado, por ejemplo, un epitelio intestinal polarizado.

[000173] Un vehículo de endocitosis en la presente puede ser una molécula que es capaz de interactuar con la proteína endógena TMEM132, permitiendo la entrada apical de este vehículo. Un vehículo de endocitosis puede permanecer asociado con TMEM132 después de la endocitosis (por ejemplo, en comparación con un vehículo de transcitosis que puede

disociarse de TMEM132 después de la endocitosis para interactuar, por ejemplo, GRP75 o una proteína ERGIC) y dentro de las regiones apicales y compartimientos de la célula (por ejemplo, una célula epitelial polarizada). En algunos casos, este vehículo de endocitosis también puede interactuar con GRP75. Estas interacciones con TMEM132 y/o GRP75 pueden permitir que el vehículo y una carga útil acoplada al mismo eviten, y al menos reduzcan significativamente (por ejemplo, menor que aproximadamente 50% en comparación con la molécula de carga útil cuando no se acopla al vehículo), la degradación lisosomal. En algunos casos, un vehículo de endocitosis puede permanecer en un compartimiento apical, y no mostrar translocación significativa a un compartimiento basal, por ejemplo, al menos aproximadamente 5, 10, 15, 30, 60, o 120 minutos después de la aplicación apical (por ejemplo, luminal) del vehículo en comparación con el vehículo de transcitosis que puede mostrar transcitosis de complemento de casi todas las moléculas apicalmente aplicadas, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15 o 30 minutos después de la aplicación apical (por ejemplo, luminal). En algunos casos, al menos aproximadamente 50%, 75%, o 90% de moléculas de vehículo permanecen en los compartimientos apicales 5 minutos después de la aplicación luminal del vehículo. En algunos casos, al menos aproximadamente 50%, 75%, o 90% de moléculas de vehículo

permanecen en los compartimientos apicales 10 minutos después de la aplicación luminal del vehículo. En algunos casos, al menos aproximadamente 50%, 75%, o 90% de moléculas de vehículo permanecen en los compartimientos apicales 15 minutos después de la aplicación luminal del vehículo. En algunos casos, al menos aproximadamente 50%, 75%, o 90% de moléculas de vehículo permanecen en los compartimientos apicales 30 minutos después de la aplicación luminal del vehículo. El porcentaje de las moléculas de vehículo que permanecen en el compartimiento apical de la célula epitelial se pueden determinar al dividir la intensidad de la señal de fluorescencia medida en un compartimiento basal de la célula por la intensidad de la señal de fluorescencia medida en el compartimiento apical de la célula en el punto de tiempo respectivo.

[000174] En otros casos, un vehículo de endocitosis que es capaz de transportar una carga útil a un compartimiento supranuclear o basal puede interactuar con una proteína ERGIC y/u otro complejo de proteína de tráfico de ER-Golgi que puede permitir que el vehículo acceda a todos los compartimientos dentro de una célula epitelial.

[000175] Un vehículo de endocitosis o transcitosis puede ser un polipéptido. Este vehículo se puede derivar de un polipéptido secretado por una bacteria, tal como *Vibrio cholerae* (en la presente como polipéptido derivado de

Cholix). Un vehículo puede ser un polipéptido quimérico derivado de dos o más polipéptidos bacterianos diferentes. Estos dos o más polipéptidos bacterianos diferentes se pueden derivar de dos o más bacterias diferentes (por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa, etc.)*, y/o derivados de dos o más cepas diferentes de una bacteria (por ejemplo, dos o más cepas diferentes de Vibrio cholerae, Pseudomonas aeruginosa, etc.).

[000176] Un vehículo puede ser un polipéptido de origen natural o de origen no natural de un polipéptido secretado por esta bacteria.

[000177] Los polipéptidos de origen no natural pueden incluir aquellos que tienen una modificación C- y/o N-terminal.

[000178] En un ejemplo, un polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos, y/o una o más supresiones de aminoácidos, y/o una o más adiciones de aminoácidos con respecto a una alineación de secuencia con un polipéptido de origen natural (por ejemplo, SEQ ID NO:). 3) o con respecto a una alineación de secuencia con una secuencia consenso (por ejemplo, SEQ ID NO: 130).

[000179] Ejemplos de sustituciones contempladas en la presente incluyen sustituciones conservadoras de uno o más aminoácidos. Los siguientes seis grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: (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); y (6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), y Triptófano (W).

[000180] Adicionalmente, o de manera alternativa, las mutaciones en un vehículo contempladas en la presente incluyen uno de: V1L, L1V, D3E, E4A, E581A, etc., por ejemplo, con respecto a la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, 2, o 130 (un número designa la posición de aminoácido, una letra antes del número designa el aminoácido modificado, y una letra después del número designa el aminoácido sustituido). En algunos casos, un vehículo comprende una valina en la posición 1, una leucina en la posición 1, un ácido aspártico en la posición 3, un ácido glutámico en la posición 3, un ácido glutámico en la posición 4, o una alanina en la posición 4 en el vehículo (numeración relativa a las posiciones en SEQ ID NO: 1).

[000181] Ejemplos de supresiones incluyen truncamientos N-terminales y truncamientos C-terminales.

[000182] Como se usa en la presente, cuando un truncamiento C-terminal se refiere como que se presenta “en” una posición de aminoácido, este aminoácido se incluye en el polipéptido truncado. Cuando un truncamiento N-terminal se refiere por presentarse “en” una posición de aminoácido, este aminoácido

se excluye del polipéptido truncado. Por ejemplo, en un caso, el vehículo comprende SEQ ID NO: 1 con un truncamiento C-terminal en la posición 386. Este vehículo termina en el aminoácido 386 (A) de SEQ ID NO: 1 en su C-terminal. Adicionalmente, el vehículo anterior se puede truncar adicionalmente en la posición 20 en su N-terminal, teniendo de esta manera un aminoácido N-terminal de prolina (P) (que es la posición 21 en la secuencia de referencia de SEQ ID NO: 1).

[000183] Los truncamientos N-terminales incluyen aquellos que remueven hasta 10, 20, 30, 39, o 40 aminoácidos en la N-terminal de una secuencia de Cholix en la presente (por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 1-3, o 130). Los truncamientos C-terminales pueden ser aquellos descritos en la presente. Estos truncamientos N- y/o C-terminales pueden dar por resultado funciones diferentes. Los truncamientos se pueden describir como relativos a una secuencia de tipo silvestre (por ejemplo, SEQ ID NO: 3), con respecto a una secuencia de origen no natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), o con respecto a una secuencia consenso (por ejemplo, SEQ ID NO: 130), en donde los residuos se numeran del extremo N al extremo C, iniciando con la posición 1 en el extremo N. Por ejemplo, un vehículo con un truncamiento C-terminal en la posición 266 con respecto a SEQ ID NO: 1 comprende los residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1.

[000184] Ejemplos de adiciones incluyen: una secuencia de péptido señal, una secuencia de péptido de purificación, u otras modificaciones N-terminales. Una secuencia de péptido señal comprende de 1 a aproximadamente 40 aminoácidos. En algunos casos, un vehículo comprende una metionina N-terminal. El término "aproximadamente", como se usa en la presente en el contexto de un valor o intervalo numérico, en general se refiere a ±10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% del valor o intervalo numérico citado o reclamado, a menos que se especifique de otra manera.

[000185] Un vehículo puede tener una identidad de secuencia sustancial (por ejemplo, aproximadamente, o mayor que, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia, o 100% de identidad de secuencia) a un polipéptido de origen no natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 3), un polipéptido de origen no natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-2), o cualquiera de los fragmentos funcionales descritos en la presente (por ejemplo, SEQ ID NO: 160-168).

[000186] El término "de identidad de secuencia" o un porcentaje (%) de identidad de secuencia, como se usa en la presente es el porcentaje de residuos en una secuencia candidato que son idénticos con los residuos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir los espacios, si es necesario, para lograr porcentaje de máxima identidad de secuencia, y no considerar ninguna de las

sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La alineación para propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, usando software de computadora públicamente disponible tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[000187] Un vehículo (por ejemplo, un vehículo de endocitosis o transcitosis) en la presente se puede derivar de un polipéptido secretado de una bacteria *Vibrio cholerae* (por ejemplo, aquellos que comprenden una secuencia de cualquiera de SEQ ID NO: 3-125 o 127-129. Este vehículo puede ser referido como un polipéptido derivado de Cholix. Un vehículo derivado de un polipéptido de Cholix puede incluir secuencias de polipéptidos de Cholix de origen natural y de origen no natural, así como aquellas secuencias que tienen al menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia a un polipéptido de Cholix de origen natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 3-78) o de origen no natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1-2) descrito en la presente. Un vehículo derivado de polipéptido de Cholix

también puede incluir fragmentos de endocitosis y/o transcitosis (por ejemplo, truncamientos N- y/o C-terminales del polipéptido de Cholix) de las secuencias de polipéptido de Cholix de origen natural y de origen no natural, en donde estos fragmentos de endocitosis y/o transcitosis pueden tener al menos aproximadamente 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, o 100% de identidad de secuencia a cualquiera de estas secuencias de polipéptidos Cholix de origen natural y de origen no natural.

[000188] La Tabla 1 proporciona secuencias Cholix de longitud completa y derivadas de Cholix ejemplares.

Tabla 1 – Secuencias de polipéptido de Cholix Ejemplares

SEQ ID NO	**Secuencia de Aminoácidos**	**Descripción**
SEQ ID NO: 1	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV	polipéptido de Cholix de origen natural

	FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 2	LEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 3	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN	polipéptido de Cholix de origen natural

	IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 4	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAKQSIAKQSIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAH WHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS YETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAME ALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQ NIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERL SALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGL TPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKPCVASNNDQAN INVESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAT HQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRG NNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYG LPTRAEREARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLEN	polipéptido de Cholix de origen natural

	AERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIG WDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSI SAKPPYKEQKDELK	
SEQ ID NO: 5	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIMDEGKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAKQSIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVA GTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAH RVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSL FVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQ INENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQT SAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIES RSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALT REGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTEN EEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRA ERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHI TQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAI HAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPP YKERKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 6	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV	polipéptido de Cholix de origen natural

	PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYERLTPAEEAVVKEAIAKEQSISAKPP YKEQKDELK	
SEQ ID NO: 7	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYERLTPAEEAVVKEAIAKEQSISAKPP YKEQKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural

SEQ ID NO: 8	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKQIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEKKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 9	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ	polipéptido de Cholix de origen natural

	AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 10	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVSTHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 11	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN	polipéptido de Cholix de

	RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEKKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	origen natural
SEQ ID NO: 12	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG	polipéptido de Cholix de origen natural

	GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIHRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 13	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 14	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL	polipéptido de Cholix de origen natural

	VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLIPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 15	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLIPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI	polipéptido de Cholix de origen natural

	PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	
SEQ ID NO: 16	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR MLFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLIPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 17	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR	polipéptido de Cholix de origen natural

	ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARLKKGTGNAELPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITHVIG HSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEVLAIDEEAVAEEQSISAKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 18	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVFFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVTERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIHRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipépti do de Cholix de origen natural
SEQ ID	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV	polipépti

NO: 19	VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERK DELK	do de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 20	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVALNNDQANINIESRSGRS	polipéptido de Cholix de origen natural

	YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 21	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQAPEVAERLSALRQINENN PGVVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAERETR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 22	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI	polipéptido de Cholix de origen

	IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAERETR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITDVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	natural
SEQ ID NO: 23	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA IMVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRYLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR	polipéptido de Cholix de origen natural

	GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISPKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 24	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKDGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSAIRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 25	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKDGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA	polipéptido de Cholix de origen natural

	ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKHCVASNNDQANINVESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 26	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWRTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK	polipéptido de Cholix de origen natural

	DELK	
SEQ ID NO: 27	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSNGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 28	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN	polipéptido de Cholix de origen natural

	PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLLENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 29	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQKNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 30	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF	polipéptido de

	ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIYAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 31	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV	polipéptido de Cholix de origen natural

	FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	
SEQ ID NO: 32	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIYAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 33	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN	polipéptido de Cholix de origen natural

	IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQKNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 34	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG	polipéptido de Cholix de origen natural

	HSLPLRNEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 35	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAERETR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITDVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 36	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAIHWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV	polipéptido de Cholix de origen natural

	PLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLEEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 37	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATIRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural

SEQ ID NO: 38	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITFGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 39	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATR ILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENN PGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ	polipéptido de Cholix de origen natural

	AADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRS YLPENRAVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYV FVGYHGTNHVAAQSIVNRISPVPRGSDTESERAWG GLYVSTDASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKAR GVMLRVYLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIG HPLPLRNEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAI PSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	
SEQ ID NO: 40	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 41	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN	polipéptido de Cholix de

	RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASDNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	origen natural
SEQ ID NO: 42	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQNIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG	polipéptido de Cholix de origen natural

	GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 43	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDIAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 44	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL	polipéptido de Cholix de origen natural

	VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 45	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMETLAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI	polipéptido de Cholix de origen natural

	PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERK DELK	
SEQ ID NO: 46	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 47	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMETLAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR	polipéptido de Cholix de origen natural

	ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	
SEQ ID NO: 48	VEDELNIFDECRSPCLLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQK DELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV	polipépti

NO: 49	VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVIPGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMETLAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKPCVASNNDQANINVESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEREAR GVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAERHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAI PSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERK DELK	do de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 50	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR	polipéptido de Cholix de origen natural

	AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKERKD ELK	
SEQ ID NO: 51	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSQKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKD ELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 52	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI	polipéptido de Cholix de origen

	IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKERKD ELK	natural
SEQ ID NO: 53	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV	polipéptido de Cholix de origen natural

	YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKD ELK	
SEQ ID NO: 54	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKD ELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 55	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGIPKAITVKQG	polipéptido de Cholix de origen natural

	IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKERKD ELK	
SEQ ID NO: 56	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGIPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKD	polipéptido de Cholix de origen natural

	ELK	
SEQ ID NO: 57	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPEVVL CFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHI DSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPENR AVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKD ELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 58	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSFN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAQKDGARHKRWAHWHTGLALCWL VPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENN	polipéptido de Cholix de origen natural

	PGMVTQVLTIARQIYNDYVTEHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYV FVGYHGTNHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWG GVYVATHAELAHRYARIKEGTGENGLPTTEEKKSR GVMLRVYLPRASLERFYRTNIPLENADEHVTQVIG HPLPLRNEAFTGPESAGGEDETAIGWDMAIHGVAI PSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEHD ELK	
SEQ ID NO: 59	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSFN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAQKDGARHKRWAHWHTGLALCWL VPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENN PGMVTQVLTIARQIYNDYVTEHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYV FVGYHGTNHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWG GVYVATHAEVNHRYARIKEGTGENGLPTTEEKKSR GVMLRVYLPRASLERFYRTNIPLENADEHVTQVIG HPLPLRNEAFTGPESAGGEDETAIGWDMAIHGVAI PSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEHD ELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 60	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF	polipéptido de

	ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSFN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAQKDGARHKRWAHWHTGLALCWL VPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENN PGMVTQVLTIARQIYNDYVTEHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYV FVGYHGTNHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWG GVYVATHAELAHRYARIKEGTGENGLPTTEKKKSR GVMLKVYLPRASLERFYRTNIPLENADEHVTQVIG HPLPLRNEAFTGPESAGGENETAIGWDMAIHGVAI PSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEHD ELK	Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 61	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG	polipéptido de Cholix de origen natural

	TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKEQKD ELK	
SEQ ID NO: 62	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVIPGEDSPASIKISVDEIDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAEQETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEGLTTDEEAVVKEAIAKEQSISAKPPYKERKD ELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 63	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSFN RKEGEFAINWLVIPGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS	polipéptido de Cholix de origen natural

	IAISWPSVSYKAAQKDGARHKRWAHWHTGLALCWL VPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENN PGMVTQVLTIARQIYNDYVTEHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYV FVGYHGTNHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWG GVYVATHAELAHRYARIKEGTGENGLPTTEEKKSR GVMLRVYLPRASLERFYRTNIPLENADEHVTQVIG HPLPLRNEAFTGPESAGGEDETAIGWDMAIHGVAI PSTIPGNSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEHD ELK	
SEQ ID NO: 64	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR	polipéptido de Cholix de origen natural

	NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	
SEQ ID NO: 65	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 66	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEQS IAISWPSVSYNAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ	polipéptido de Cholix de origen natural

	VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINVESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	
SEQ ID NO: 67	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVL CFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 68	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI	polipéptido de Cholix de origen

	IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	natural
SEQ ID NO: 69	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKMYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR	polipéptido de Cholix de origen natural

	NEAFTGPERVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	
SEQ ID NO: 70	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQKRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVL CFYEEPELCTYGEDWHGGAYKTVAGTPEAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLQDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 71	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPEVVL CFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHI DSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQ	polipéptido de Cholix de origen natural

	VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPENR AVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHG TNHVAAQSIVNRISPVPRGSDTESERAWGGLYVST DASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARGVMLRV YLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPLR NEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPG NSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	
SEQ ID NO: 72	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPEVVL CFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHI DSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQ VLTVARQIYNDYVTHHPLLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPENR AVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHG TNHVAAQSIVNRISPVPRGSDTESERAWGGLYVST DASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARGVMLRV YLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPLR NEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPG NSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 73	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI	polipéptido de Cholix de origen

	IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPEVVL CFFEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHI DSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNSDQANINIESRSGRSYLPENR AVITQQGVTNWTYQELEATHQALTQEGYVFVGYHG TNHVAAQSIVNRISPVPRGSDTESERAWGGLYVST DASVAYGYARIQEGTADGGGLTPAERKARGVMLRV YLPQASLERFYRINADLEKERNLVERVIGHPLPLR NEAFTGTDAEEGSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPG NSYAQLPIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	natural
SEQ ID NO: 74	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLFIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVL CFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAIEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR	polipéptido de Cholix de origen natural

	NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	
SEQ ID NO: 75	VEDELNIFDECRSPCSLTPELGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTL CFYEDPAQCTYGDDWYGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDTDKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREDYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 76	VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVL CFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ	polipéptido de Cholix de origen natural

	VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	
SEQ ID NO: 77	VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVL CFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQAPEVAERLSDLRRINEDNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELETTHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 78	VEDELKIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI	polipéptido de Cholix de origen

	IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVL CFYEDPELCTYGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQG IEQKAVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGNGGLPTRAERETRGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIYAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	natural
SEQ ID NO: 79	TPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDAPFG VINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPIGED SPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG SRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQNCTL GDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIH FSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDD LSCAYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQ EPEVAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYND YVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCV ASNSDQANINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVTNW TYQELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVN RISPVPRGSDTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARI QEGTADGGGLTPAERKARGVMLRVYLPQASLERFY RINADLEKERNLVERVIGHPLPLRNEAFTGTDAEE	polipéptido de Cholix de origen natural

	GSDETAIGWDMAIHGVAIPSTIPGNSYAQLPIDEE AVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	
SEQ ID NO: 80	SIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESI ITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL DQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSV TRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTG LALCWLVPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETV AGTPKAITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAA HRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSCAYQAQNIVS LFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALR QINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQ TSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIE SRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQAL TREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTE NEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTR AERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEH ITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMA IHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKP PYKERKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 81	MTINDEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYV NQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINW LVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID LDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISW PSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDA IYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQ GIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETL ARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSH LDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVT QVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADIL	polipéptido de Cholix de origen natural

	SLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPEN RAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYH GTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVA THAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLR VYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPL RNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIP GNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	
SEQ ID NO: 82	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFTINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVS YKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSR KPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV FTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLT VARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFC PDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVI TPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNH VAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAE VAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIP RASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA FTGPESAGGEDETIIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 83	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVS YKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNY	polipéptido de Cholix de origen natural

	ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSR KPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLT VARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFC PDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVI TPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNH VAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAE VAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIP RASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 84	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVS YKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNY ITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSR KPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSV FTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLT VARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFC PDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVI TPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNH VAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAE VAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIP RASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEA FTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 85	MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYV NQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINW	polipéptido de

	LVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID LDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSY KAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCT YGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKAVEQRI HFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPD DLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE QEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYN DYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN WTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIV NRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYAR IKEGTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERF YRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESA GGEDETVIGWDMAIYAVAIPSTIPGNAYEELAIDE EAVAKEQSISAKPPYKEQKDELK	Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 86	MTINDEQNDIKDEDKGESIITIGDFATVRATRHYV NQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINW LVPIGEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSID LDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSY KAAHKNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCT YGDDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRI HFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPD DLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDE QEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYN DYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSC VASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTN WTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIV NRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYAR IKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERF YRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPERV	polipéptido de Cholix de origen natural

	DGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDE EAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	
SEQ ID NO: 87	CSLTPEPGKPIQSQLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL EEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE RAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 88	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK	polipéptido de Cholix de origen natural

	SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 89	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 90	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ	polipéptido de Cholix de origen natural

	RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLIPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK PCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 91	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDDLSCVYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL EEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITDVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 92	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI	polipéptido de Cholix de

	GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVALNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	origen natural
SEQ ID NO: 93	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAIMVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRYL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE	polipéptido de Cholix de origen natural

	RVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 94	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKDGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPAVAERLSAIRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 95	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKDGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV	polipéptido de Cholix de origen natural

	TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYLTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 96	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 97	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL	polipéptido de Cholix de origen natural

	TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY TRIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 98	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFYPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 99	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ	polipéptido de Cholix de origen

	TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	natural
SEQ ID NO: 100	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQKN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural

SEQ ID NO: 101	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 102	CSLTPELGKPIQSKLSISSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK PCVASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT	polipéptido de Cholix de origen natural

	IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 103	CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 104	CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL	polipéptido de Cholix de origen natural

	EEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 105	CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASDNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 106	CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ	polipéptido de Cholix de origen natural

	KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK PCVASNNDQANINVESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAEREARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAERHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 107	CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK SCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQT IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE RVDGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	polipépti do de Cholix de origen natural
SEQ ID	CSLTPELGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN	polipépti

NO: 108	DDQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ KEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPIDAIYNYITQQN CTLGDNWFGGSYETVAGTPKAITVKQGIEQKPVEQ RIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL PDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQI YNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADK PCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGV TNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQN IVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGY ARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLE RFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPE SAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	do de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 109	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIMDEGKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAKQSIAISWPSVS YKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFFEDPELC TYGEDWHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQR IHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLP DDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLD EQEPEVAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIY NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKS CVASNNDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVT NWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTI VNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYA	polipépti do de Cholix de origen natural

	RIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLER FYRTNTLLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPES AGGEDETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 110	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDA PFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDD WHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQ ELEATHQALTREDYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 111	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDA PFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWETQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDD WHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT	polipéptido de Cholix de origen natural

	HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQ ELEATHQALTREDYVFVGYHGTNHAAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 112	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDD WHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQ ELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 113	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDD	polipéptido de Cholix de origen natural

	WHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQAPE VAERLSDLRRINEDNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQ ELETTHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 114	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDD WHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQ ELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGNGGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIYAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 115	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA	polipéptido de

	PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDEIDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWFTTSPKVTLCFYEDPAQCTYGDD WHGGAYKTVAGIPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQ ELEATHQALTREDYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAEQETRGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIHAVAIPS	Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 116	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEEPELCTYGED WHGGAYKTVAGTPGAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK GNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQ ELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN	polipéptido de Cholix de origen natural

	TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 117	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQKRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEEPELCTYGED WHGGAYKTVAGTPEAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPA VAERLSALRQINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQ ELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIHAVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 118	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIIIIGEFATVRATRHYVNQDA PFGVINLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWLTTLPKVVLCFYEDPELCTYGDD WHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK GNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSC AYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPE VAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN	polipéptido de Cholix de origen natural

	NDQANINIESRSGRSYLPENRVVITPQGVTNWTYQ ELDATHQALTREDYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRIA PVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEG TGEYGLPTRAERETRGVMLRVYIPRASLERFYRTN TPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGED ETVIGWDMAIHAVAIPS	
SEQ ID NO: 119	CSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDA PFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPI GEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYGDD WHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC AYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPE VAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN SDQANINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVTNWTYQ ELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRIS PVPRGSDTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEG TADGGGLTPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRIN ADLEKERNLVERVIGHPLPLRNEAFTGTDAEEGSD ETAIGWDMAIHGVAIPS	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 120	CSLTPEPGKPIQSKLSIPGDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVSQDA PFGVINLDITTENGTKTYSFNRKESEFAINWLVPI GEDSPASIKISIDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ TLEQWENQGNVSFAVTRPEQSIAISWPSVSYKAAH KNGSRHKRWANWLTTLPEVVLCFFEDPELCTYGDD WHGGAYKTVAGTPKAITVKQGIEQKTVEQRIHFSK	polipéptido de Cholix de origen natural

	KNAMEALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLPDDLSC AYNAQQIVSLFLATRILFTHIDSIFTLNLDGQEPE VAERLDDLRRINENNPGMVIQVLTVARQIYNDYVT HHPGLTPEQTSASAQAADILSLFCPDADKSCVASN SDQANINIESRSGRSYLPENRAVITQQGVTNWTYQ ELEATHQALTQEGYVFVGYHGTNHVAAQSIVNRIS PVPRGSDTESERAWGGLYVSTDASVAYGYARIQEG TADGGGLTPAERKARGVMLRVYLPQASLERFYRIN ADLEKERNLVERVIGHPLPLRNEAFTGTDAEEGSD ETAIGWDMAIHGVAIPS	
SEQ ID NO: 121	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKQIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVINLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLTDDLSCVYQAQNIVSLFVATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSALRQINENN PGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEKKWG GLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDAR GVMLRV	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 122	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI	polipéptido de Cholix de origen

	IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAEKDGARHKRWAHWHTGLALCWL VPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENN PGMVTQVLTIARQIYNDYVTEHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLLCPDADGSCVASNSDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYV FVGYHGTNHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWG G	natural
SEQ ID NO: 123	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSFN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWETQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAEKDGARHKRWAHWHTGLALCWL VPLDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGMEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARGRKPRDLTDDLQCAYQAQNIVSLFLATR ILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLTDLRRINENN PGMVTQVLTIARQIYNDYVTEHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADESCVASNSDQANINIESRSGRS YLPENRAVITPQGVTNWTYQELEAKHQTLTREGYV FVGYHGTNHVAAQSIVNRITPVPRGNNTEKEEEWG G	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 124	YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWP SVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAI YNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQG IEQKPVEQRIHFSNGNAMSALAAHRVCGVPLETLA	polipéptido de Cholix de origen

	RSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKDELK	natural
SEQ ID NO: 125	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQKRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWENQGNVSFAVTRPEQS IAISWPSVSYKAAHKNGSRHKRWANWLTTLPKVVL CFYEEPELCTYGEDWHGGAYKTVAGTPEAITVKQG IEQKTVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGVPLETLA RSRKPRDLQDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHL DSVFTLNLDEQEPAVAERLSALRQINENNPGMVTQ VLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPENR AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHV	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 126	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPGDV VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEF ATVRATRHYVSQDAPFGVINLDITTENGTKTYSFN RKESEFAINWLVPIGEDSPASIKISIDELDQQRNI IEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHN IAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWL	polipéptido de Cholix de origen natural

	VPIDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKA ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKKNAMEALAAHRVCGV PLETLARSRKPRDLPDDLSCAYNAQQIVSLFLATR ILFTHIDSIFTLNLDGQEPEVAERLDDLRRINENN PGMVIQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQ AADILSLFCPDADKSCVASNSDQANINIES	
SEQ ID NO: 127	LFSHLDSVFTLNLHEQEPAVAERLSALRQINENNP GMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA ADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSY LPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVF VGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGG LYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARG VMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGH SLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIP STIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISAKPPYKERKD ELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 128	AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK	polipéptido de Cholix de origen natural
SEQ ID NO: 129	AVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHG TNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVAT HAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRV YIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLR NEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPG NAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDEL	polipéptido de Cholix de origen natural

[000189] La tabla 2 proporciona una secuencia de consenso

(SEQ ID NO: 130, fórmula I) de polipéptidos derivados de Cholix que se pueden usar como vehículos en la presente.

Tabla 2 – Fórmula I

SEQ ID NO: 130	X1-E-X3-X4-L-X6-I-F-D-E-C-R-S-P-C-X16-L-T-P-E-X21-G-K-X24-I-Q-S-K-L-X30-I-P-X33-D-V-V-L-D-E-G-V-L-Y-Y-S-M-T-I-N-D-E-Q-N-D-I-X56-D-E-X59-K-G-E-S-I-I-T-X67-G-E-F-A-T-X73-R-A-T-R-H-Y-V-X81-Q-D-A-P-F-G-V-I-X90-L-D-I-T-T-E-N-G-T-K-X101-Y-S-X104-N-R-K-X108-X109-E-F-X112-I-X114-W-L-V-X118-X119-G-E-D-S-P-A-S-I-K-I-S-X131-D-E-X134-D-Q-X137-R-N-I-I-E-V-P-K-L-Y-S-I-D-L-D-N-Q-T-L-E-Q-W-X160-X161-Q-G-N-V-X166-F-X168-V-T-R-P-E-X174-X175-I-A-I-S-W-P-S-V-S-Y-X186-A-A-X189-K-X191-G-X193-R-H-K-R-W-A-X200-W-X202-T-X204-X205-X206-X207-X208-X209-L-X211-X212-X213-X214-X215-X216-X217-X218-X219-X220-X221-X222-X223-X224-C-T-X227-G-X229-X230-W-X232-G-G-X235-Y-X237-T-V-A-G-X242-P-X244-X245-I-X247-V-K-Q-G-X252-E-Q-K-X256-V-E-Q-R-I-H-F-S-X265-X266-N-A-X269-X270-X271-L-A-A-H-R-V-C-G-V-P-L-E-T-L-A-R-X288-R-K-P-R-X293-L-X295-D-D-L-X299-C-X301-Y-X303-A-Q-X306-I-V-S-L-F-X312-A-T-R-X316-L-F-X319-H-X321-D-S-X324-F-T-L-N-L-X330-X331-Q-X333-P-X335-V-X337-E-R-L-X341-X342-X343-R-X345-I-N-E-X349-N-P-G-X353-V-X355-Q-V-L-T-X360-A-R-Q-I-Y-N-D-Y-V-T-X371-H-P-X374-L-X376-P-E-Q-T-S-A-X383-A-Q-A-A-D-I-L-S-L-X393-X394-P-D-X397-D-X399-X400-C-V-A-X404-X405-X406-D-Q-A-N-I-N-X413-E-S-R-S-G-R-S-Y-L-X423-E-N-R-A-V-I-T-X431-Q-G-V-T-N-W-T-Y-Q-E-L-X443-X444-X445-H-Q-X448-L-T-X451-

	E-X453-Y-V-F-V-G-Y-H-G-T-N-H-X465-A-A-Q-X469-I-V-N-R-I-X475-P-V-P-R-G-X481-X482-T-E-X485-E-X487-X488-W-G-G-X492-Y-V-X495-T-X497-A-X499-X500-X501-X502-X503-Y-X505-R-X507-X508-X509-G-T-X512-X513-X514-X515-X516-X517-T-X519-X520-X521-X522-X523-X524-R-G-V-M-L-X530-V-Y-X533-X534-X535-A-S-L-E-R-F-Y-R-X544-N-X546-X547-L-E-X550-X551-X552-X553-X554-X555-X556-X557-V-I-G-H-X562-L-P-L-R-N-E-A-F-T-G-X573-X574-X575-X576-X577-G-X579-X580-E-T-X583-I-G-W-D-X588-A-I-X591-X592-V-A-I-P-S-T-I-P-G-N-X603-Y-X605-X606-L-X608-X609-X610-E-E-A-X614-A-X616-E-Q-S-I-S-X622-K-P-P-Y-K-E-X629-X630-D-E-L-K; en donde X1 se selecciona del grupo que consta de V y L; X3 se selecciona del grupo que consta de E y D; X4 se selecciona del grupo que consta de A y E; X6 se selecciona del grupo que consta de N y K; X16 se selecciona del grupo que consta de S y L; X21 se selecciona del grupo que consta de P y L; X24 se selecciona del grupo que consta de P y Q; X30 se selecciona del grupo que consta de S y F; X33 se selecciona del grupo que consta de S y G; X56 se selecciona del grupo que consta de K y M; X59 se selecciona del grupo que consta de D y G; X67 se selecciona del grupo que consta de I y F; X73 se selecciona del grupo que consta de V y I; X81 se selecciona del grupo que consta de N y S; X90 se selecciona del grupo que consta de H y N; X101 se selecciona del grupo que consta de T y M; X104 se selecciona del grupo que consta de Y y F; X108 se selecciona del grupo que

	consta de E y D; X109 se selecciona del grupo que consta de G y S; X112 se selecciona del grupo que consta de A y T; X114 se selecciona del grupo que consta de N y H; X118 se selecciona del grupo que consta de P e I; X119 se selecciona del grupo que consta de I y P; X131 se selecciona del grupo que consta de V e I; X134 se selecciona del grupo que consta de L e I; X137 se selecciona del grupo que consta de Q y K; X160 se selecciona del grupo que consta de K y E; X161 se selecciona del grupo que consta de T y N; X166 se selecciona del grupo que consta de S y F; X168 se selecciona del grupo que consta de S y A; X174 se selecciona del grupo que consta de H y Q; X175 se selecciona del grupo que consta de N, S, SIAKQS, y SIAKQSIAKQS; X186 se selecciona del grupo que consta de K y N; X189 se selecciona del grupo que consta de Q, E, y H; X191 se selecciona del grupo que consta de E, N, y D; X193 se selecciona del grupo que consta de S y A; X200 se selecciona del grupo que consta de H y N; X202 se selecciona del grupo que consta de H, L, F, y R; X204 se selecciona del grupo que consta de G y T; X205 se selecciona del grupo que consta de L y S;X206 se selecciona del grupo que consta de A y P; X207 se selecciona del grupo que consta de L, E, y K;X208 se selecciona del grupo que consta de C y V; X209 se selecciona del grupo que consta de W, V, y T; X211 se selecciona del grupo que consta de V y sin aminoácido; X212 se selecciona del grupo que consta de P y sin

	aminoácido; X213 se selecciona del grupo que consta de M, I, L, y sin aminoácido; X214 se selecciona del grupo que consta de D y sin aminoácido; X215 se selecciona del grupo que consta de A y sin aminoácido; X216 se selecciona del grupo que consta de I y sin aminoácido; X217 se selecciona del grupo que consta de Y y C; X218 se selecciona del grupo que consta de N y F; X219 se selecciona del grupo que consta de Y y F; X220 se selecciona del grupo que consta de I y E; X221 se selecciona del grupo que consta de T y D; X222 se selecciona del grupo que consta de Q y P; X223 se selecciona del grupo que consta de Q, E, y A; X224 se selecciona del grupo que consta de N, L, y Q; X227 se selecciona del grupo que consta de L e Y; X229 se selecciona del grupo que consta de D y E; X230 se selecciona del grupo que consta de N y D; X232 se selecciona del grupo que consta de F, H, e Y; X235 se selecciona del grupo que consta de S y A; X237 se selecciona del grupo que consta de E y K; X242 se selecciona del grupo que consta de T e I; X244 se selecciona del grupo que consta de K, E, y G; X245 se selecciona del grupo que consta de V y A; X247 se selecciona del grupo que consta de T y M; X252 se selecciona del grupo que consta de I y M; X256 se selecciona del grupo que consta de P, T, y A; X265 se selecciona del grupo que consta de K, Q, y N; X266 se selecciona del grupo que consta de G y K; X269 se selecciona del grupo que consta de M e I; X270 se selecciona

	del grupo que consta de S y E; X271 se selecciona del grupo que consta de A y T; X288 se selecciona del grupo que consta de S y G; X293 se selecciona del grupo que consta de D e Y; X295 se selecciona del grupo que consta de T, P, y Q; X299 se selecciona del grupo que consta de S y Q; X301 se selecciona del grupo que consta de A y V; X303 se selecciona del grupo que consta de Q y N; X306 se selecciona del grupo que consta de N y Q; X312 se selecciona del grupo que consta de V y L; X316 se selecciona del grupo que consta de I y M; X319 se selecciona del grupo que consta de S y T; X321 se selecciona del grupo que consta de L e I; X324 se selecciona del grupo que consta de V e I; X330 se selecciona del grupo que consta de D, E, y H; X331 se selecciona del grupo que consta de E y G; X333 se selecciona del grupo que consta de E y A; X335 se selecciona del grupo que consta de E y A; X337 se selecciona del grupo que consta de A y T; X341 se selecciona del grupo que consta de S, D, y T; X342 se selecciona del grupo que consta de D y A; X343 se selecciona del grupo que consta de L e I; X345 se selecciona del grupo que consta de R y Q; X349 se selecciona del grupo que consta de N y D; X353 se selecciona del grupo que consta de M y V; X355 se selecciona del grupo que consta de T e I; X360 se selecciona del grupo que consta de V e I; X371 se selecciona del grupo que consta de H y E; X374 se selecciona del grupo que consta de G y L; X376 se selecciona del grupo que consta de T

	e I; X383 se selecciona del grupo que consta de G y S; X393 se selecciona del grupo que consta de F y L; X394 se selecciona del grupo que consta de C e Y; X397 se selecciona del grupo que consta de A y T; X399 se selecciona del grupo que consta de K, E, y G; X400 se selecciona del grupo que consta de S, P, y H; X404 se selecciona del grupo que consta de S y L; X405 se selecciona del grupo que consta de N y D; X406 se selecciona del grupo que consta de N y S; X413 se selecciona del grupo que consta de I y V; X423 se selecciona del grupo que consta de P y L; X431 se selecciona del grupo que consta de P y Q; X443 se selecciona del grupo que consta de E y D;X444 se selecciona del grupo que consta de A y T; X445 se selecciona del grupo que consta de T y K; X448 se selecciona del grupo que consta de A y T; X451 se selecciona del grupo que consta de R y Q; X453 se selecciona del grupo que consta de G y D; X465 se selecciona del grupo que consta de V y A;X469 se selecciona del grupo que consta de T, S, y N; X475 se selecciona del grupo que consta de A, S, y T; X481 se selecciona del grupo que consta de N y S; X482 se selecciona del grupo que consta de N y D; X485 se selecciona del grupo que consta de N, S, y K; X487 se selecciona del grupo que consta de E, R, y K; X488 se selecciona del grupo que consta de K, A, y E; X492 se selecciona del grupo que consta de L y V; X495 se selecciona del grupo que consta de A y S; X497 se selecciona del grupo que consta de H

	y D; X499 se selecciona del grupo que consta de E y S; X500 se selecciona del grupo que consta de V y L; X501 se selecciona del grupo que consta de A y N; X502 se selecciona del grupo que consta de H e Y; X503 se selecciona del grupo que consta de G y R; X505 se selecciona del grupo que consta de A y T; X507 se selecciona del grupo que consta de I y L; X508 se selecciona del grupo que consta de K y Q; X509 se selecciona del grupo que consta de E y K; X512 se selecciona del grupo que consta de G y A; X513 se selecciona del grupo que consta de E, D, y N; X514 se selecciona del grupo que consta de Y, G, A, y N; X515 se selecciona del grupo que consta de G y E; X516 se selecciona del grupo que consta de L y G; X517 se selecciona del grupo que consta de P y L; X519 se selecciona del grupo que consta de R, P, y T; X520 se selecciona del grupo que consta de A y E; X521 se selecciona del grupo que consta de E y K; X522 se selecciona del grupo que consta de R, Q, y K; X523 se selecciona del grupo que consta de D, K, y E; X524 se selecciona del grupo que consta de A, T, y S; X530 se selecciona del grupo que consta de R y K; X533 se selecciona del grupo que consta de I y L; X534 se selecciona del grupo que consta de P y H; X535 se selecciona del grupo que consta de R y Q; X544 se selecciona del grupo que consta de T e I; X546 se selecciona del grupo que consta de T, A, e I; X547 se selecciona del grupo que consta de P y D; X550 se selecciona del grupo que

	consta de N y K; X551 se selecciona del grupo que consta de A y E; X552 se selecciona del grupo que consta de E, R, y D; X553 se selecciona del grupo que consta de E, N, y R; X554 se selecciona del grupo que consta de H y L; X555 se selecciona del grupo que consta de I y V; X556 se selecciona del grupo que consta de T y E; X557 se selecciona del grupo que consta de Q, R, H, y D; X562 se selecciona del grupo que consta de S y P; X573 se selecciona del grupo que consta de P y T; X574 se selecciona del grupo que consta de E y D; X575 se selecciona del grupo que consta de S, A, y R; X576 se selecciona del grupo que consta de A, E, y V; X577 se selecciona del grupo que consta de G, E, y D; X579 se selecciona del grupo que consta de E y S; X580 se selecciona del grupo que consta de D y N; X583 se selecciona del grupo que consta de V y A; X588 se selecciona del grupo que consta de M e I; X591 se selecciona del grupo que consta de H e Y; X592 se selecciona del grupo que consta de A y G; X603 se selecciona del grupo que consta de A y S; X605 se selecciona del grupo que consta de E y A; X606 se selecciona del grupo que consta de E, A, Q, G, V, y R; X608 se selecciona del grupo que consta de A, P, y T; X609 se selecciona del grupo que consta de I, T, y P; X610 se selecciona del grupo que consta de D y A; X614 se selecciona del grupo que consta de V y VVKEAI; X616 se selecciona del grupo que consta de K y E; X622 se selecciona del grupo que consta

	de T, A, y P; andX629 se selecciona del grupo que consta de R, Q, y H; y X630 se selecciona del grupo que consta de K y sin aminoácido.

[000190] Los vehículos pueden incluir todos los polipéptidos derivados de Cholix que tienen una actividad de ribosilación ADP reducida o extirpada (por ejemplo, ribosilación del factor de alargamiento 2) con respecto a un polipéptido de Cholix de origen natural tal como uno con una secuencia de SEQ ID NO: 3. Estos vehículos pueden ser referidos como vehículos no tóxicos. Ejemplos de estos polipéptidos derivados de Cholix incluyen cualquiera de los polipéptidos con una secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-10 que pueden tener una supresión en la posición 581 (por ejemplo, una supresión de E581, por ejemplo, en SEQ ID NO: 189), una sustitución en la posición 581 (por ejemplo, una sustitución E581A), o una supresión o sustitución alternativa que vuelve el vehículo no tóxico. En algunos casos, un vehículo tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 130 con una mutación en la posición 581. En algunos casos, un vehículo tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-3 con una mutación en la posición 581.

[000191] En algunos casos, un vehículo comprende, consta escencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos de cualquiera de la Tabla 1 o Tabla 2 con una supresión,

sustitución y/o adición C-terminal que da por resultado de esta manera una actividad de ribosilación ADP reducida o extirpada. Esta supresión, sustitución, y/o adición mantiene una funcionalidad de transporte tal como transcitosis o endocitosis. Como tal, algunos de los vehículos en la presente se someten a transcitosis, ya sean solos o junto con una carga útil heteróloga, mientras que algunos de los vehículos en la presente se someten a endocitosis, ya sea solos, o junto con una carga útil heteróloga.

[000192] En algunos casos, un primer vehículo derivado de un primer polipéptido de Cholix puede tener propiedades mejoradas comparadas con un segundo vehículo derivado de un segundo polipéptido de Cholix. Estas propiedades pueden incluir la capacidad de un vehículo a transportar una carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada (o capa celular), una estabilidad de un vehículo (por ejemplo, una estabilidad *in vivo* o una estabilidad *ex vivo* tal como vida de anaquel), la capacidad de un vehículo a ser expresado funcionalmente en un sistema de expresión tal como *E. coli* o células CHO, la capacidad de un vehículo a ser purificado, por ejemplo, usando métodos cromatográficos, y la capacidad de multimerizar (por ejemplo, dimerizar, cuando, por ejemplo, se asocia (por ejemplo, se acopla) con una carga útil heteróloga. De manera sorprendente se puede mostrar que un primer vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que

tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 puede tener una o más de las siguientes propiedades comparadas con un segundo vehículo derivado de un polipéptido de Cholix que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3 y/o 126: (i) una función de transcitosis mejorada (por ejemplo, una velocidad de transporte incrementado para transportar una carga útil a través de las células epiteliales); (ii) la expresión funcional mejorada (por ejemplo, rendimiento de producción más altos) en *E. coli* y/o células CHO; (iii) propiedades de purificación mejoradas (por ejemplo, purezas más altas y rendimientos de recuperación); y (iv) una estabilidad in vivo mejorada (por ejemplo, una proteasa incrementada y/o estabilidad de pH, temperatura de fusión). Esta estabilidad *in vivo* se puede determinar al incubar el vehículo con, por ejemplo, células Caco-2 o al administrar (por ejemplo, al inyectar en un lumen) el vehículo a un mamífero (por ejemplo, un roedor o un ser humano). La función de transcitosis potenciada, por ejemplo, una velocidad o velocidad de transportabilidad se puede determinar, por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1 por la determinación de la cantidad de vehículo transportado y/o carga útil en una cámara basolateral en ciertos puntos de tiempo (por ejemplo, 1, 5, 10, 15, 20, o 30 minutos después de la aplicación apical del vehículo o constructo de suministro). En algunos casos, la estabilidad de un vehículo contra una proteasa se puede determinar al

incubar el vehículo con la proteasa (por ejemplo, tripsina) en ciertas relaciones molares (por ejemplo, 1:1) y a temperatura ambiente, y al medir la cantidad de vehículo intacto en diversos puntos de tiempo (por ejemplo, 5, 10, 15, 30, o 45 minutos) utilizando, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño. La estabilidad del vehículo a un cierto pH se puede determinar al incubar el vehículo con un agente amortiguador que tiene el pH apropiado (por ejemplo, pH 5,5, 6, 6,5, 7, etc.) y al medir la cantidad de vehículo intacto en varios puntos de tiempo (por ejemplo, 5, 10, 15, 30 min.) utilizando, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño.

[000193] Un vehículo de transcitosis puede transportar una carga útil, acoplada a la misma, a través de una célula epitelial. Este transporte se puede presentar *in vitro*, por ejemplo, usando las monocapas de células epiteliales tal como monocapas de células Caco-2 o SMI-100. En otros casos, este transporte se puede presentar *in vivo*, por ejemplo, a través de un epitelio intestinal de un sujeto (por ejemplo, un roedor o un humano) en los compartimientos de la submucosa tal como la *lamina propria*.

[000194] El mecanismo de acción de un vehículo de transcitosis puede implicar uno o más de: endocitosis mediada por receptor en una célula epitelial polarizada a través de la interacción con TMEM132, LMAN1 y/o GPR75, evitación de la

ruta de destrucción lisosomal a través de la interacción con GRP75, transporte apical a basal a través de la interacción con un receptor ERGIC (por ejemplo, ERGIC-53), y liberación de la membrana basal en los compartimientos de la submucosa tal como la *lamina propria* a través de la interacción con el perlecan (HSPG).

[000195] Un vehículo de transcitosis puede ser uno que interactúa con una o más de las siguientes proteínas endógenas: TMEM132A, GPR75, proteína ERGIC, y perlecan (HSPG) como se muestra en los **Ejemplos 10** y **12**. La interacción de un vehículo de transcitosis con un receptor de entradas apical tal como TMEM132A puede permitir la entrada apical del vehículo en una célula epitelial polarizada. La interacción de un vehículo de transcitosis con un receptor de evitación de lisosoma tal como GRP75 puede permitir que el vehículo y una carga útil acoplada al mismo evite la degradación lisosomal, permitiendo de esta manera el transporte del vehículo e inalterado y funcionalmente intacto y la carga útil. La interacción de un vehículo de transcitosis con una proteína de transporte apical a basal tal como una proteína ERGIC (por ejemplo, ERGIC-53) puede permitir que el vehículo, una vez sometido a endocitosis, se mueva al sitio basal de la célula epitelial. La interacción de un vehículo de transcitosis con una proteína de liberación basal tal como perlecan puede permitir que el vehículo entre a los sistemas

de reciclaje basales y la exocitosis del vehículo en los compartimientos basolaterales, tal como los compartimientos de la submucosa (por ejemplo, *lamina propria*).

[000196] Por otra parte, un vehículo de transcitosis puede co-localizarse con cualquiera de una o más de la proteína de recubrimiento I (COPI) antígeno de endosoma temprano 1 (EEA1) para secuestrar la maquinaria de transporte apical a basal endógena, y con la proteína 11a relacionada a Ras (Rab11a) en el lado basal de la célula epitelial para entrar a los sistemas de secreción basales como se muestra en el Ejemplo 10.

[000197] En algunos casos, un vehículo de transcitosis no se co-localiza con la proteína 7 relacionada con Ras (Rab7) y/o la proteína de membrana 1 asociada lisosomal (LAMP1) durante el transporte a través de esta célula epitelial, permitiendo que este vehículo evite la degradación lisosomal como se muestra en el Ejemplo 10.

[000198] Ejemplos de vehículos de transcitosis incluyen aquellos que tienen un truncamiento C-terminal de cualquiera de SEQ ID NO 178 o 130, en donde el truncamiento C-terminal se puede presentar en la C-terminal del polipéptido en cualquiera de la posición de aminoácido después del residuo C-terminal en la posición 195 (por ejemplo, truncamiento en cualquiera de las posiciones 195-634 de SEQ ID NO: 1-2). Las posiciones de aminoácidos para el truncamiento se pueden

determinar usando la alineación de secuencia a la secuencia consenso SEQ ID NO: 130 o cualquiera de las secuencias de referencia SEQ ID NO: 1, 2 o 3. La siguiente Tabla 3 ilustra vehículos ejemplares al identificar varias secuencias de residuos de aminoácidos de estos vehículos y se pueden truncar las posiciones C-terminal que SEQ ID NO 178, o 130. En algunos casos, los vehículos de transcitosis incluyen aquellos que tienen un truncamiento C-terminal de cualquiera de SEQ ID NO 12 o 478.

Tabla 3 – vehículos de Transcitosis Ejemplares que Identifican Residuos de Aminoácidos de Cualesquiera de SEQ ID NO: 1-78 o 130

Residuos de AA	Residuos de AA	Residuos de AA
1-195	1-246	1-297
1-196	1-247	1-298
1-197	1-248	1-299
1-198	1-249	1-300
1-199	1-250	1-301
1-200	1-251	1-302
1-201	1-252	1-303
1-202	1-253	1-304
1-203	1-254	1-305
1-204	1-255	1-306
1-205	1-256	1-307
1-206	1-257	1-308
1-207	1-258	1-309
1-208	1-259	1-310

1-209	1-260	1-311
1-210	1-261	1-312
1-211	1-262	1-313
1-212	1-263	1-314
1-213	1-264	1-315
1-214	1-265	1-316
1-215	1-266	1-317
1-216	1-267	1-318
1-217	1-268	1-319
1-218	1-269	1-320
1-219	1-270	1-321
1-220	1-271	1-322
1-221	1-272	1-323
1-222	1-273	1-324
1-223	1-274	1-325
1-224	1-275	1-326
1-225	1-276	1-327
1-226	1-277	1-328
1-227	1-278	1-329
1-228	1-279	1-330
1-229	1-280	1-331
1-230	1-281	1-332
1-231	1-282	1-333
1-232	1-283	1-334
1-233	1-284	1-335
1-234	1-285	1-336
1-235	1-286	1-337
1-236	1-287	1-338
1-237	1-288	1-339

1-238	1-289	1-340
1-239	1-290	1-341
1-240	1-291	1-342
1-241	1-292	1-343
1-242	1-293	1-344
1-243	1-294	1-345
1-244	1-295	1-346
1-245	1-296	1-347

[000199] Estos vehículos de transcitosis se pueden truncar adicionalmente en su N-terminal en una posición de aminoácidos hasta la posición 20 N-terminal (por ejemplo, SEQ ID NO: 79 que se trunca en la posición 17 N-terminal (comienza con la posición 18)).

[000200] También se contemplan en la presente vehículos de transcitosis tal que tienen al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia, a cualquiera de las secuencias de vehículo mostradas en la **Tabla 3**.

[000201] En un caso, el vehículo comprende SEQ ID NO: 1 con un truncamiento C-terminal en la posición 386. En un caso, el vehículo comprende SEQ ID NO: 2 con un truncamiento C-terminal en la posición 386. En un caso, el vehículo comprende SEQ ID NO: 479 con un truncamiento C-terminal en la posición 386. En un caso, el vehículo comprende SEQ ID NO: 130 con un truncamiento C-terminal en la posición 386. En

estos casos, la secuencia no incluye SEQ ID NO: 3 con un truncamiento C-terminal en la posición 386. En estos casos, la secuencia no incluye SEQ ID NO: 126.

[000202] Cuando un vehículo derivado de Cholix tiene un truncamiento C-terminal en la posición 386, puede ser referido en la presente como Cholix^{386}. El "386" designa el truncamiento C-terminal después del aminoácido que se alinea más estrechamente con la posición 386 donde la secuencia es parte de o se alinea con SEQ ID NO: 130. Un cholix^{386} no necesita que el polipéptido tenga 386 aminoácidos en él. Por ejemplo, un truncamiento de SEQ ID NO: 79 en la posición 386 da por resultado un vehículo que es más corto que los 386 residuos de aminoácidos. Ejemplos de moléculas de vehículo de Cholix^{386} incluyen cualquiera de SEQ ID NO: 1-79 o 130 truncadas en la posición 386 ya que se alinean en la identidad de secuencia más alta con SEQ ID NO 130 o se alinean con cualquiera de SEQ ID NO: 1-3 para la identidad de secuencia más alta, por ejemplo, terminando con los residuos de aminoácidos "AQA."

[000203] Un Cholix^{386} también puede incluir polipéptidos que mantienen sustancialmente la misma función como SEQ ID NO: 180 pero con una o más adiciones/supresiones/sustituciones, y que tienen al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a las moléculas Cholix^{386} descritas en la presente.

[000204] Otro ejemplo de un vehículo derivado de Cholix de transcitosis es Cholix^{266}. En un caso, un Cholix^{266} consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 181. Otros fragmentos de Cholix^{266} pueden incluir aquellos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-78 truncados en la posición de aminoácidos 266 como se alinea para la identidad de secuencia más alta con SEQ ID NO 130 o se alinea con cualquiera de SEQ ID NO 1-3 para la identidad de secuencia más alta. De manera alternativa, un vehículo puede tener cualquier secuencia de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130) truncada en la C-terminal en la posición 266.

[000205] Otro ejemplo de un vehículo derivado de Cholix de transcitosis es Cholix^{251}. En un caso, un Cholix^{251} consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 182. Otros fragmentos de Cholix^{251} pueden incluir aquellos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-78 truncados en la posición de aminoácido 251 como se alinea para la identidad de secuencia más alta con SEQ ID NO 130 o se alinea con cualquiera de SEQ ID NO 1-3 para la identidad de secuencia más alta. De manera alternativa, un vehículo puede tener cualquier secuencia de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130) truncada en la C-terminal en la posición 251.

[000206] Otro ejemplo de un vehículo derivado de Cholix de transcitosis es Cholix^{245}. En un caso, un Cholix^{245} consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 183. Otros

fragmentos de Cholix^{245} incluyen aquellos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-79 truncados en la posición de aminoácido 245 como se alinea para la identidad de secuencia más alta con SEQ ID NO 130 o se alinea con cualquiera de SEQ ID NO 1-3 para la identidad de secuencia más alta. De manera alternativa, un vehículo puede tener cualquier secuencia de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130) truncada en la C-terminal en la posición 245.

[000207] Otro ejemplo de un vehículo derivado de Cholix de transcitosis es Cholix^{206}. En un caso, un Cholix^{206} consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 184. Otros fragmentos de Cholix^{206} incluyen aquellos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-78 truncados en la posición de aminoácido 206 como se alinea para la identidad de secuencia más alta con SEQ ID NO 130 o se alinea con cualquiera de SEQ ID NO 1-3 para la identidad de secuencia más alta. De manera alternativa, un vehículo puede tener cualquier secuencia de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130) truncada en la C-terminal en la posición 206.

[000208] Otros ejemplos de vehículos incluyen aquellos que tienen un truncamiento C-terminal en cualquiera de la posición de aminoácido 195634 de la secuencia expuesta en Fórmula I (SEQ ID NO: 130). De manera preferente, este truncamiento está en una posición de aminoácido de cualquiera de 195-347 de la secuencia expuesta en Fórmula I (SEQ ID NO: 130).

[000209] En la N-terminal, un vehículo de transcitosis

puede tener cualquiera de los aminoácidos 1-20 de SEQ ID NO: 1-78, o 130. En algunas modalidades, la N-terminal del vehículo tiene los residuos de aminoácidos 120 de SEQ ID NO: 1 o 2 (100% de identidad de secuencia en las posiciones 1-20), o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a los residuos de aminoácidos 1-20 de SEQ ID NO: 1 o 2. En algunas modalidades, Los primeros cuatro aminoácidos en la N-terminal son VEEA (SEQ ID NO: 185). En algunas modalidades, este vehículo no comprende SEQ ID NO: 126. En algunas modalidades, la N-terminal del vehículo tiene los residuos de aminoácidos 1-20 de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). Cualquiera de este vehículo puede tener opcionalmente una modificación N-terminal como se describe en la presente. Esta modificación N-terminal puede ser una metionina N-terminal. Ejemplos de estos vehículos son aquellos que comprenden, que constan esencialmente de, o que constan de una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 131-135.

[000210] Como tal, un portador de transcitosis puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia, o tiene 100% de identidad de secuencia, a los residuos de aminoácidos der la posición 1 a cualquiera de los residuos de

aminoácidos en cualquiera de las posiciones 205-275 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130).

[000211] En estos casos, un portador de transcitosis consta, consta escencialmente de, o comprende residuos de aminoácidos 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-251, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-206, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205, o 5-205 de los residuos de aminoácidos expuesta en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). En varios casos, este vehículo puede consistir o consistir esencialmente de los residuos de aminoácidos 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-251, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-206, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205, o 5-205 de los mismos residuos de aminoácidos expuestos en cualquiera de SEQ ID NO: 1-78.

[000212] Específicamente, en algunos casos, este vehículo de transcitosis puede comprender, consistir esencialmente de, o consiste de los residuos de aminoácidos 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-251, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-206, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205, o 5-205 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1.

[000213] De manera alternativa, en algunos casos, este vehículo de transcitosis puede comprender, consistir

esencialmente de, o consiste de los residuos de aminoácidos 1-275, 1-266, 1-265, 2-265, 3-265, 4-265, 5-265, 1-251, 1-250, 2-250, 3-250, 4-250, 5-250, 1-245, 2-245, 3-245, 4-245, 5-245, 1-206, 1-205, 2-205, 3-205, 4-205, o 5-205 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

[000214] Un vehículo se puede modificar en su N-terminal. Estas modificaciones N-terminales incluyen grupos funcionales que pueden mejorar la expresión y/o estabilidad del polipéptido. Estas modificaciones terminales se pueden ilustrar por la siguiente designación "FG-vehículo", en donde FG es un grupo funcional unido a la N-terminal del vehículo. Ejemplos de grupos funcionales contemplados en la presente incluyen una metionina para la expresión bacteriana y otra secuencia señal para la expresión en las células CHO o células HEK-293. Ejemplos de vehículos de transcitosis con una metionina N-terminal incluyen aquellas que tienen una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 131-135 (Tabla 4). Cabe destacar que los grupos funcionales también se pueden acoplar también a la C-terminal de un vehículo.

Tabla 4 – vehículos Derivados de Cholix Transcitosis Ejemplares

SEQ ID NO	Secuencia
SEQ ID NO: 131	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN

	GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLA
SEQ ID NO: 132	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK V
SEQ ID NO: 133	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQG
SEQ ID NO: 134	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG
SEQ ID NO: 135	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRD LTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSD LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
SEQ ID NO:	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN

184	DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLY SIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLA
SEQ ID NO: 183	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLY SIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV
SEQ ID NO: 182	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLY SIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQG
SEQ ID NO: 181	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLY SIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKG
SEQ ID NO: 180	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLY SIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK RWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKV ITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDL TDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDL RRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
SEQ ID NO:	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI

178	NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQGIEQKPVEQRIHFSK
SEQ ID NO: 191	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRD LTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSD LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESCENLFQ
SEQ ID NO: 192	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRD LTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSD LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQACENLF Q
SEQ ID NO: 193	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRD LTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSD

	LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILS LFCPDADKSCVASNNDQANINIESCENLFQSGTCHHHHHH
SEQ ID NO: 194	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTEN GTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL YSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH KRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK VITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRD LTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSD LRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQACENLF QSGTCHHHHHH

[000215] Usando la información de estructura de cristal de un vehículo derivado de Cholix que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 178, se identificaron un puñado de regiones que pueden desempeñar una función en endocitosis y transcitosis. Estas regiones son referidas en la presente como X_1, X_2, X_3, X_4, X_5. X_1 abarca los residuos de aminoácidos 17 – 25, tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 160, y puede desempeñar una función en el trasporte apical a basal de un vehículo, por ejemplo, al permitir la interacción de un vehículo con una proteína ERGIC (por ejemplo, ERGIC-53). X_2 abarca los residuos de aminoácidos 170 - 176, tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 161, y puede desempeñar una función en el acceso del vehículo a los compartimientos supranucleares y para moverse del sitio apical al basal de una célula epitelial, por ejemplo, al

permitir la interacción de un vehículo con una proteína ERGIC. X_3 abarca los residuos de aminoácidos 186 – 202, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 162, y puede desempeñar una función en la liberación basal del vehículo en los compartimientos basolaterales, por ejemplo, al permitir la interacción de un vehículo con una proteína de liberación basal tal como perlecan. X_4 abarca los residuos de aminoácidos 31 – 39, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 163, y puede desempeñar una función en el movimiento del vehículo del sitio apical a una célula epitelial al sitio basal, por ejemplo, al permitir la interacción de un vehículo con una proteína ERGIC. X_5 abarca los residuos de aminoácidos 135 - 139, que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 164, y puede desempeñar una función en la entrada apical de un vehículo en una célula epitelial, por ejemplo, al permitir la interacción de un vehículo con un receptor de entrada apical tal como TMEM132.

[000216] De esta manera, en algunas modalidades, un vehículo de transcitosis incluye los residuos de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 178, o 130 en X_1, X_2, X_3, X_4, y/o X_5. Por ejemplo, un vehículo en la presente puede tener los aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 o 2, o una secuencia que tiene en la identidad de secuencia sustancial a la misma; proporcionada sin embargo que cualquiera de uno o más de X_1, X_2, X_3, X_4, y X_5 sean idénticos a aquellos de SEQ ID NO: 1 o

2. En una modalidad, todos de X_1, X_2, X_3, X_4, X_5 son idénticos a aquellos de SEQ ID NO: 1 o 2. Lo mismo se puede decir para todos los otros vehículos y vehículos derivados de Cholix descritos en la presente, tal como aquellos proporcionados en la Tabla 3 o Tabla 4.

[000217] En algunas modalidades, los vehículos de transcitosis incluyen aquellos que tienen una secuencia de cualquiera de uno o más de los polipéptidos de secuencia de Cholix expuestos en SEQ ID NO: 1-78 o 130. En algunos casos, se excluyen aquellos polipéptidos que tienen una secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 o una truncada SEQ ID NO: 3 con un truncamiento C-terminal en el residuo 425-348, 291, 266, 265, 251, 250, 245, 244, 234, 206, 205, 187, 186, 151, 150, 134, 133 así como el fragmento que consta de los residuos de 40-187 de SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, los vehículos de transcitosis excluyen aquellos que comprenden, que constan esencialmente, o que constan de una secuencia de SEQ ID NO: 126.

[000218] Sorprendentemente, también se ha identificado que los vehículos más cortos que los vehículos de transcitosis pueden transportar una carga útil heteróloga a una célula epitelial polarizada sin el transporte significativo de esta carga útil a través de la célula epitelial. Estos vehículos pueden ser referidos en la presente como “vehículos de endocitosis”. Los vehículos de endocitosis pueden terminar en

una vesícula intracelular o citosol de la célula epitelial.

[000219] Ejemplos de vehículos de endocitosis incluyen aquellos que tienen residuos de aminoácidos de cualquiera de las posiciones 1-40 a cualquiera de las posiciones 145-194 de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). En algunas modalidades, un vehículo de endocitosis tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO: 1-80 o 82-120, que tiene un truncamiento C-terminal en cualquiera de las posiciones de aminoácidos de 145-194.

[000220] Por otra parte, cualquiera de los vehículos de endocitosis puede tener además un truncamiento N-terminal. Este truncamiento N-terminal puede remover hasta 40 aminoácidos de la N-terminal del vehículo. Por ejemplo, se contemplan en la presente vehículos que tienen aminoácidos VLYY (SEQ ID NO: 186) o GVLYY (SEQ ID NO: 187) en la N-terminal que es representativa de la posición de aminoácido 41-44 y 40-44 de SEQ ID NO: 130, respectivamente. En algunos casos, un vehículo comprende un mayor grado de disparidad de secuencia en las posiciones 1-40 en comparación con los aminoácidos 41 a la C-terminal (por ejemplo, una C-terminal en un residuo de aminoácidos seleccionado de las posicione s 145-194) de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-80 o 82-120, o SEQ ID NO: 130. Un vehículo comprende de manera preferente, consta escencialmente de o consta de os residuos de aminoácidos de

cualquiera de las posiciones 1-20 a cualquiera de las posiciones 150-187, o de cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 21-41 al residuo de aminoácido en la posición 187 o 205 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). La Tabla 5 proporciona residuos de aminoácidos ejemplares que un vehículo de endocitosis puede comprender, consta escencialmente de o consta de.

Tabla 5 –Residuos de Aminoácidos Ejemplares de los vehículos de Cholix de Cualquiera de SEQ ID NO: 1-78 o 130

Residuos de AA Cholix	**Residuos de AA Cholix**
1-150	1-178
1-151	1-179
1-152	1-180
1-153	1-181
1-154	1-182
1-155	1-183
1-156	1-184
1-157	1-185
1-158	1-186
1-159	1-187
1-160	22-187
1-161	23-187
1-162	24-187
1-163	25-187
1-164	26-187

1-165	27-187
1-166	28-187
1-167	29-187
1-168	30-187
1-169	31-187
1-170	32-187
1-171	33-187
1-172	34-187
1-173	35-187
1-174	38-187
1-175	39-187
1-176	40-187
1-177	41-187

[000221] En algunos casos, este vehículo tiene un truncamiento N-terminal en la posición 39 de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). En otros casos, este vehículo tiene un truncamiento N-terminal en la posición 40 de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). Cuando este vehículo también se trunca en su C-terminal en cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 145-206 (es decir, que tiene residuos C-terminal de cualquiera de los residuos 145-206) de la secuencia expuesta en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130), este vehículo se puede usar para endocitosis de una carga útil en una célula epitelial y transporta esta carga útil a los compartimientos apicales de esta célula epitelial (ver, por ejemplo, Ejemplo 4). Cualquiera de estos vehículos de

endocitosis descritos en la presente también puede comprender una modificación N-terminal tal como una metionina N-terminal. Ejemplos de este vehículo son aquellos que comprenden, que constan esencialmente de, o que constan de los residuos de aminoácidos 41-187 de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 137), o de los residuos de aminoácidos 40-205 de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 138).

[000222] En algunas modalidades, un vehículo de endocitosis puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de los residuos de aminoácidos 1-150 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-78, o 130. En algunas modalidades, un vehículo de endocitosis puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de los residuos de aminoácidos 1-151 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-78, o 130. En algunas modalidades, un vehículo de endocitosis puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de los residuos de aminoácidos 1-186 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-78, o 130. En algunas modalidades, un vehículo de endocitosis puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de los residuos de aminoácidos 1-187 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-78, o 130. En un caso, el vehículo tiene los aminoácidos 1-150, 1-151, 1-186, o 1-187 de SEQ ID NO: 1. En otro caso el vehículo tiene los aminoácidos 1-150, 1-151, 1-186, 1-187 de SEQ ID NO: 2.

[000223] Cualquiera de los vehículos de endocitosis en la presente puede tener un grupo funcional (tal como una metionina) unida a la N-terminal. Ejemplos de potadores de endocitosis con una metionina N-terminal incluyen aquellas con las secuencias expuestas en cualquiera de SEQ ID NO: 136 o 139.

[000224] En otros casos, este vehículo de endocitosis comprende los residuos de aminoácidos de la posición 40 o 41 a cualquiera de los residuos de aminoácidos en las posiciones 187-206 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130).

[000225] En estos casos, un vehículo de endocitosis puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de los residuos de aminoácidos 40-187 o 41-187 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-80, 82-120, o 130. En otros casos, un vehículo capaz de transportar una carga útil heteróloga a una célula epitelial polarizada puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de los residuos de aminoácidos 40-205 o 41-205 de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 1-80, 82-120, o 130.

[000226] Este vehículo puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de los residuos de aminoácidos 40-187, 41-187, 40-205, o 41-205 de SEQ ID NO: 1. Las secuencias de aminoácidos ejemplares de estos vehículos incluyen aquellos que constan de, constan esencialmente de, o

comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 137 y 138. Estos vehículos pueden ser capaces de transportar una carga útil a un compartimento apical de una célula epitelial polarizada, pero no a un compartimiento basal como aquellos vehículos que carecen de los residuos de aminoácidos 1-39 que pueden desempeñar una función en el transporte apical a basal.

[000227] Un vehículo de endocitosis puede comprender el fragmento de endocitosis que consta de los residuos de aminoácidos de la posición 134 a la posición 151 de la secuencia de aminoácidos expuesta en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). En algunos casos, este fragmento funcional tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 165, o una identidad de secuencia alta (por ejemplo, >90%) a la misma. Los vehículos ejemplares incluyen aquellos que pueden constar de, constar esencialmente de, o comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 136-139 (Tabla 6). Los vehículos que carecen de uno o ambos fragmentos funcionales con SEQ ID NO: 166-167 (Tabla 11) pueden transportar la carga útil heteróloga a los compartimentos apicales de las células epiteliales que pueden incluir ubicaciones en las vesículas apicales, en el citosol apical de la célula, y/o en los sistemas de reciclaje apicales tal como endosomas de reciclaje apicales. Este vehículo puede interactuar con un receptor de entrada apical tal como TMEM132 (por ejemplo,

TMEM132A), pero no, o no significativamente con las proteínas de tráfico basal o perlecan (HSPG) y pueden co-localizarse con Rab11a en compartimientos apicales de la célula epitelial después de la endocitosis. En algunos casos, este vehículo puede constar de, constar esencialmente de, o comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 137-139 (Tabla 6).

Tabla 6 - vehículos Derivados de Cholix de Endocitosis Ejemplares

SEQ ID NO	**Secuencia**
SEQ ID NO: 136	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA
SEQ ID NO: 137	MVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA
SEQ ID NO: 138	MGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL
SEQ ID NO: 139	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL

[000228] En otras modalidades, un vehículo de endocitosis

puede comprender los fragmentos funcionales que constan de los residuos de aminoácidos de la posición 1 a la posición 40 y la posición 152 a la posición 187, respectivamente, de la secuencia de aminoácidos expuesta en la **Fórmula I** (SEQ ID NO: 130). En algunos casos, estos fragmentos tienen las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 166 y 167, respectivamente, o una identidad de secuencia alta (por ejemplo, >90%) a uno o ambos de estos fragmentos funcionales. Este vehículo puede interactuar con un receptor de tráfico apical a basal, pero no significativamente con perlecan. Este receptor de tráfico permite que este vehículo transporte una carga útil a un compartimento supranuclear y/o basal de una célula epitelial polarizada. Este vehículo puede constar de, constar esencialmente de, o comprenden los aminoácidos 1-187 de SEQ ID NO: 130. Un ejemplo de este vehículo es uno que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 136.

[000229] En algunos casos, un vehículo de endocitosis no es un fragmento de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3. En algunos casos, este vehículo no es un fragmento de cualquiera de las secuencias expuestas en SEQ ID NO: 4-80, o 82-120. En estos casos, un vehículo no comprende o consta de los residuos de aminoácidos 1-151, 1-187 o 40-187 de SEQ ID NO: 3.

D. Regiones de Secuencia Funcionales de los vehículos

[000230] En cualquiera de las modalidades en la presente,

una o más regiones de secuencia funcionales dentro de una secuencia de vehículo puede tener una identidad de secuencia alta localizada (por ejemplo, >90%) a los residuos de aminoácidos encontrado en esas regiones en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130) a fin de mantener la funcionalidad a través de numerosos polipéptidos y modalidades. En algunos casos, los residuos de aminoácidos en esas regiones se pueden restringir a aquellos encontrados en los polipéptidos de Cholix de origen natural tal como aquellos que tienen la secuencia expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 1-80 o 82-120.

1. Dominio de Endocitosis

[000231] En algunos casos, un vehículo comprende un dominio que permite que el vehículo entre a una célula epitelial (por ejemplo, una célula epitelial polarizada) en el sitio apical. En algunos casos, este dominio permite que el vehículo interactúe con un receptor de entrada apical. Este receptor de entrada apical puede ser TMEM132 o TMEM132A. Este dominio de interacción TMEM132 puede tener una secuencia consenso de los residuos de aminoácidos 135-151 de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130) o de los residuos de aminoácidos de las posiciones 135-151 de cualquiera de SEQ ID NO: 1-120. TMEM132A es una proteína transmembrana que es responsable para la entrada apical de un vehículo en una célula epitelial. A fin de mantener la interacción del vehículo con TMEM132A, en algunas modalidades, un vehículo en la presente incluye una SEQ ID

NO: 165 que expone una secuencia consenso para un dominio de interacción TMEM132A. Alternativamente, un vehículo en la presente puede incluir los residuos de aminoácidos 135-151 de cualquiera de uno o más de SEQ ID NO: 1-120, o 130 como su dominio de interacción TMEM132.

[000232] Por otra parte, se asume sorprendentemente que las subregiones dentro del dominio de interacción TMEM132 puede ser particularmente relevante para la entrada apical del vehículo. De esta manera, un vehículo en la presente puede interactuar con un receptor de entrada apical tal como TMEM132 a través de una región de interacción con un motivo de aminoácido que tiene los residuos de aminoácidos 135-139 de SEQ ID NO: 130 (por ejemplo, “DQQRN” de SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 164). De esta manera, cualquiera de los vehículos en la presente (incluyendo polipéptidos de los mismos) pueden incluir este motivo, o el dominio de interacción TMEM132 completo (por ejemplo, SEQ ID NO: 165) a fin de proporcionar la entrada en las células epiteliales en el lado apical. Como tal las regiones pueden tener las funciones dentro del vehículo, las secuencias de aminoácidos en estas regiones se pueden conservar, o tienen solamente hasta 1, 2 o 3 residuos de aminoácidos que son sustituciones, inserciones, y/o supresiones.

[000233] Cualquiera de los vehículos en la presente puede incluir un dominio de interacción TMEM132 o regiones de

interacción de receptor a fin de entrar a la célula epitelial. Por ejemplo, un vehículo que comprende los residuos de aminoácidos 1-151 de SEQ ID NO: 1, que incluye un dominio de interacción TMEM132 de SEQ ID NO: 165 puede entrar a células epiteliales en el lado apical. Similarmente, un vehículo de Cholix^{266}, tal como un vehículo que comprende los residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 181), incluye el dominio TMEM132 y ambos pueden entrar al lado apical de las células epiteliales a través del dominio TMEM132 y transportar una carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada. Otros vehículos ejemplares que comprenden un dominio de interacción TMEM132 son Cholix^{187}, Cholix^{206}, Cholix^{245}, Cholix^{251}, y Cholix^{386} (por ejemplo, SEQ ID NO: 136, y 180-184). En algunos casos, un vehículo es uno que tiene los residuos de aminoácidos 1-187, 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, o 1-386 de SEQ ID NO: 1.

[000234] Por otra parte, un vehículo que carece de un dominio de interacción TMEM132, tal como M-Cholix^{134} que tiene SEQ ID NO: 140 puede permanecer en el lumen intestinal y no, o no significativamente (por ejemplo, menor que 10% del material vehículo que se aplicó a la superficie apical), entran a la célula epitelial (ver, por ejemplo, ejemplo 6).

2. Dominios de Orientación de Compartimento Supranuclear y Basal

[000235] En algunos casos, un vehículo comprende los

residuos de aminoácidos N-terminales 1-40 de la secuencia expuesta en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). Este vehículo se puede usar para transportar una carga útil heteróloga de un compartimento apical a supranuclear o basal (y en los compartimentos de la submucosa, si este vehículo también puede interactuar con una proteína de liberación basal tal como perlecan) de una célula epitelial después de la endocitosis del vehículo en la célula. Ejemplos de estos vehículos incluyen aquellos que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 131-135 (Tabla 4).

[000236] En algunos casos, un vehículo comprende los residuos de aminoácidos 17-25 y/o 31-39 de la secuencia expuesta en la Fórmula I (SEQ ID NO: 130). Estas regiones pueden restringirse a aquellos residuos de aminoácidos encontrados en un polipéptido de Cholix de origen natural o incluyen hasta 1, 2, 3 o 4 sustituciones, inserciones y/o supresiones de aminoácidos. Las sustituciones pueden ser una o más sustituciones conservadoras o no conservadoras. La 1, 2, 3 o 4 sustituciones de aminoácidos, inserciones y/o supresiones pueden conservar una función de los aminoácidos 17-25 y/o 31-39. En algún caso, un vehículo tiene una secuencia de origen natural en 17-25 y/o 31-39. En estos casos, los aminoácidos 17-25 de un vehículo pueden tener la secuencia de SEQ ID NO: 160, y/o los aminoácidos 31-39 del vehículo pueden tener la secuencia de SEQ ID NO: 163. La

función de los aminoácidos 17-25 y 31-39 puede ser el transporte apical a basal. Esta función se puede determinar cómo se describe en cualquier lugar en la presente, por ejemplo, al generar vehículos que comprenden truncamientos N-terminales en estos residuos y comparar las capacidades del transporte apical a basal de estos vehículos a aquellos que no tienen un truncamiento N-terminal (ver, por ejemplo, Ejemplos 5 y 6). Los vehículos ejemplares que comprenden estas regiones y son capaces del transporte apical a supranuclear y/o basal pueden comprender, consistir esencialmente de, o constan de los residuos de aminoácidos 1-187, 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, y 1-386 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1. En estos casos, un vehículo puede constar de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 131-136.

[000237] En algunos casos, un vehículo usa un dominio adicional para acceder al compartimento supranuclear y/o basal. Este dominio puede tener una secuencia consenso de los residuos de aminoácidos 152-187 de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130) o de los residuos de aminoácidos de las posiciones 152-187 de cualquiera de SEQ ID NO: 1-120. La función de este dominio puede ser acceder a las regiones supranucleares dentro de una célula epitelial, alcanzar los compartimentos basales dentro de una célula epitelial, y/o para co-localización del vehículo con los elementos de la red trans-

Golgi tal como la proteína del recubrimiento I (COPI).

[000238] Por ejemplo, los vehículos tal como Cholix[187] o Cholix[206], por ejemplo, vehículos con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 136 y 131, respectivamente, que incluyen esta región de orientación supranuclear y basal son capaces de acceder a las regiones supranucleares y los compartimentos basales dentro de un célula epitelial, mientras que un vehículo sin este dominio, tal como un Cholix[151] (por ejemplo, SEQ ID NO: 139) permanece en el lado apical de la célula epitelial y no accede significativamente a las regiones supranucleares o los compartimentos basales (ver, por ejemplo, Ejemplo 6)

[000239] Se cree que la secuencia de los residuos de aminoácidos 170176 de SEQ ID NO: 130 (por ejemplo, “TRPEHNI”, SEQ ID NO: 161) puede ser de relevancia particular para un vehículo para acceder a estos compartimentos supranucleares y basales y co-localizarse con COPI.

[000240] Por consiguiente, en algunos casos, un vehículo comprende un dominio de orientación supranuclear y basal, o secuencia consenso de los residuos de aminoácidos 170-176 de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130), o SEQ ID NO: 161 (que corresponden a los residuos de aminoácidos 170-176 de SEQ ID NO: 1). Este vehículo también puede incluir un dominio de interacción TMEM132A como se describe en lo anterior.

[000241] El dominio de orientación supranuclear y basal es

uno que puede tener las variaciones de secuencia mínimas. Como tal, un vehículo en la presente puede comprender un dominio de orientación supranuclear y basal que tiene los residuos de aminoácidos de los polipéptidos de origen natural tal como aquellos con SEQ ID NO: 3-120, o pueden comprender solo hasta 1, 2 o 3, residuos de aminoácidos que son sustituciones, inserciones y/o supresiones con respecto a los residuos de los polipéptidos de origen natural tal como aquellos con SEQ ID NO: 3-120.

[000242] Los vehículos ejemplares que comprenden un dominio de orientación supranuclear son Cholix^{187}, Cholix^{206}, Cholix^{245}, Cholix^{251}, Cholix^{266} y Cholix^{386}. En algunos casos, un vehículo es uno que tiene los residuos de aminoácidos 1-187, 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, o 1-386 de SEQ ID NO: 1.

3. Dominio de Transcitosis

[000243] En algunos casos, un vehículo comprende un dominio de transcitosis. Este dominio puede incluir de manera preferente una secuencia consenso de los residuos de aminoácidos 188-206 de la Fórmula I (SEQ ID NO: 130) o de los residuos de aminoácidos de las posiciones 188-206 de cualquiera de SEQ ID NO: 1-120. La función de los residuos de aminoácidos 188-206 puede ser múltiple y puede desempeñar una función en la transcitosis. La región de transcitosis puede permitir la interacción de un vehículo con los socios de interacción similar a receptor de transporte (también

referidos en la presente como “TRIP”), compartimiento 53 intermedio de Golgi de retículo endoplásmico (ERGIC-53, también referido en la presente como LMAN1), proteína 75 regulada con glucosa (GRP75), y perlecan en una manera dependiente y/o secuencial de pH. Estas interacciones pueden permitir que el vehículo acceda a los sistemas de reciclaje basales que liberan el vehículo (junto con cualquiera de la carga útil heteróloga acoplada al mismo) de la membrana basal de la célula epitelial en el compartimento basolateral (por ejemplo, *lámina propia*).

[000244] Ejemplos de vehículos capaces de transcitosis incluyen vehículos derivados de Cholix tal como Cholix^{206}, Cholix^{245}, Cholix^{251}, Cholix^{266}, y Cholix^{386}. En algunos casos, estos vehículos tienen una secuencia de aminoácidos de aquellas con los residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, y 1-386 de SEQ ID NO: 130. En algunos casos, estos vehículos tienen una secuencia de aminoácidos de aquellas con los residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, y 1-386 de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, estos vehículos tienen una secuencia de aminoácidos de aquellas con los residuos de aminoácidos 1-206, 1-245, 1-251, 1-266, y 1-386 de SEQ ID NO: 2. Ejemplos de estos vehículos con grupo de función, metionina N-terminal, se proporcionan en SEQ ID NO: 131 – SEQ ID NO: 135. Este vehículo (por ejemplo, Cholix^{206}, Cholix^{245}, Cholix^{251}, Cholix^{266}, y Cholix^{386}) se puede usar para transporte

rápido (por ejemplo, al menos 10^{-6} cm/seg, 10^{-5} cm/seg) y eficiente (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 20%, 25%, o 50% de material aplicado a la superficie apical) de una carga útil a través de una célula epitelial (ver, por ejemplo, Ejemplo 5).

[000245] Se postula que la secuencia de los residuos de aminoácidos 188-206 (por ejemplo, "AQKEGSRHKRWAHWHTGLA", SEQ ID NO: 168) con su uno o más residuos de histidina pueden actuar como un cambio de pH, permitiendo de esta manera que el vehículo interactúe con TRIP tal como TMEM132, LMAN1, GRP75, y perlecan en una manera secuencial y/o dependiente de pH.

[000246] La siguiente **Tabla 7** muestra las secuencias de polipéptidos derivadas de Cholix adicionales descritas en la presente.

Tabla 7 - Ejemplos Adicionales de las Secuencias de Polipéptidos Derivadas de Cholix

SEQ ID NO	**Secuencia**
SEQ ID NO: 140	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSM TINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDI TTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL
SEQ ID NO: 179	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDIT TENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS YETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPL

	ETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSDLRRINE
SEQ ID NO: 189	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMT INDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDIT TENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGS YETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPL ETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNL DEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLT PEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLP ENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTI VNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLP TRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLP LRNEAFTGPESAGGEDTVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEE AVAKEQSISTKPPYKERKDELK

III. Carga Útil Heteróloga

[000247] Las cargas útiles heterólogas contempladas en la presente pueden ser de cualquier naturaleza, incluyendo terapéutica, de diagnóstico y de imagenología. Una carga útil puede ser parte de un constructo de suministro. Un constructo de suministro puede incluir un vehículo acoplado a la carga útil heteróloga. La carga útil se puede acoplar directamente o indirectamente, covalentemente o no covalentemente, al vehículo. Cuando se une covalentemente, una carga útil se puede unir directamente a un vehículo o a través de un espaciador.

[000248] La carga útil heteróloga puede ser una molécula pequeña, un ácido nucleico, un polipéptido, una proteína, una nanopartícula, o una combinación de las mismas.

Cargas Útiles Terapéuticas

[000249] En algunos casos, la carga útil terapéutica es un polipéptido tal como, por ejemplo, una citocina, una hormona, un factor de crecimiento, un anticuerpo terapéutico, un ácido nucleico, un antígeno, una enzima, un factor de coagulación, neurotransmisor o un polímero.

[000250] Las citocinas proporcionadas en la presente incluyen quimiocinas e interleucinas (también abreviadas como "IL"). La interleucina puede ser una 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, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, IL-36, IL-37, IL-38, IL-39, o IL-40.

[000251] En algunos casos, la interleucina es una IL-10 o una IL-22. La interleucina puede ser de cualquier especie (por ejemplo, de un humano o un roedor) y es de manera preferente del organismo al cual se propone administrar la carga útil o el constructo de suministro que comprende eta carga útil. De esta manera, en algunos casos, la interleucina es una interleucina humana. Una interleucina proporcionada en la presente puede ser un precursor a una interleucina

secretada, madura. Esta interleucina precursora puede comprender una secuencia de péptido señal. Por ejemplo, en algunos casos, una carga útil terapéutica puede ser un precursor de una proteína secretada, madura. En otros casos, la carga útil terapéutica es la proteína secretada. Por ejemplo, en algunos casos, la carga útil comprende, consta escencialmente de, o consta de SEQ ID NO 141, que es un precursor, de longitud completa de IL-22. En otros casos, la carga útil comprende, consta escencialmente de, o consta de SEQ ID NO: 142, que es una forma secretada de IL-22. En otro ejemplo, la carga útil comprende, consta escencialmente de, o consta de SEQ ID NO 144, que es un precursor, de longitud completa de IL-10. En otros casos, la carga útil comprende, consta escencialmente de, o consta de SEQ ID NO: 145, que es una forma secretada de IL-10.

[000252] Una carga útil heteróloga puede comprender una metionina N-terminal. Por ejemplo, una carga útil de IL-22 puede comprender una metionina N-terminal. En estos casos, la IL-22 puede tener una secuencia de SEQ ID NO: 143.

[000253] En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una IL-22. La IL-22 puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 141 o la SEQ ID NO: 142, o un fragmento funcional de la

misma. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica comprende, consta escencialmente de, o consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 142.

[000254] En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es una IL-10. La IL-10 puede comprender, consistir esencialmente de, o constan de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 144 o la SEQ ID NO: 145, o un fragmento funcional de la misma. En algunas modalidades, la carga útil terapéutica comprende, consta escencialmente de, o consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 145.

[000255] Las hormonas proporcionadas en la presente pueden incluir hormonas de péptido y polipéptido. Estas hormonas pueden incluir hormonas de crecimiento, por ejemplo, hormona de crecimiento humana (también referida en la presente como hGH o somatotropina); hormonas de la pituitaria, por ejemplo, gonadotropina coriónica, cosintropina, menotropinas, iorticotropinas, protirelina, tirotropina, vasopresina, lispresina; hormonas de paratiroides; hormonas de la tiroides; hormonas testiculares; hormonas gastrointestinales, por ejemplo, polipéptido inhibidor gástrico, factor de crecimiento epidérmico-urogastrona, polipéptido inhibidor gástrico, péptido liberador de gastrina, gastrinas, pentagastrinas, tetragastrinas, motilina, neuropéptido Y,

péptido YY, secretina, péptido intestinal vasoactivo, sincálido; hormonas de incretina, por ejemplo, péptido-1 similar a glucagón (GLP-1) y polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa (GIP); hormonas metabólicas, por ejemplo, insulina; y cualquiera de los derivados o fragmentos de los mismos.

[000256] En algunas modalidades, la hormona es una hormona de crecimiento humano que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 146 o 190, o un fragmento de las mismas.

[000257] En algunas modalidades, la carga útil terapéutica es el agente reductor de glucosa. En estos casos, la carga útil puede ser un agente GLP-1 o un agonista de GLP-1. Este agonista puede ser Exenatida o Liraglutida. En otros casos, el agente reductor de glucosa puede ser una incretina, una pro-proteína glucagón, un péptido similar a glucagón (por ejemplo, diferente a GLP-1), un polipéptido relacionado con glicentina, una exendina-3, una exendina-4, lixisenatida (nombres comerciales AdlyxinMR, y LyxumiaMR, Sanofi), liraglutido (nombre comercial VictozaMR, Novo Nordisk A/S), semaglutido (nombre comercial OzempicMR, Novo Nordisk A/S), albiglutido (nombre comercial TanzeumMR, GlaxoSmithKline;

dinero GLP-1 fusionada a albúmina), dulaglutido (nombre comercial TrulicityMR, Eli Lilly), un polipéptido insulinotrópico dependiente de glucosa, Tirzepatida (Eli Lilly), Agonista del Receptor de Calcitonina Amilina Doble DACRA-089, Glargina/LantusMR, Glulisina/ApidraMR, Glarina/ToujeoMR, InsumanMR, Detemir/LevemirMR, Lispro/HumalogMR/LiprologMR, HumulinMR, Linjeta, SuliXenMR, NN1045, Insulin plus SymlinMR, PE0139, insulinas de acción rápida y acción corta (por ejemplo Linjeta, PH20, NN1218, HinsBet), (APC-002) hidrogel, insulinas orales, inhalables, transdérmicas y sublinguales (por ejemplo ExuberaMR, NasulinMR, AfrezzaMR, TregopilMR, TPM 02, Capsulin, Oral-lynMR, CobalaminMR, insulina oral, ORMD-0801, NN1953, NN1954, NN1956, VIAtab, e insulina oral Oshadi).

[000258] En algunos casos, la carga útil terapéutica es un anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión al mismo. Los anticuerpos terapéuticos pueden incluir anticuerpos anti-TNFα. Estos anticuerpos anti-TNFα pueden ser anticuerpos humanizados o humanos. Los agentes anti-TNFα pueden incluir infliximab (RemicadeMR), adalimumab (HumiraMR) o etanercept (ENBRELMR).

[000259] En algunos casos, la carga útil es un agente antineoplásico. Los agentes antineoplásicos pueden incluir nitrosoureas, por ejemplo, carmustina, lomustina, semustina, estrepzotocina; metilhidrazinas, por ejemplo, procarbazina,

dacarbazina; hormonas esteroidales, por ejemplo, glucocorticoides, estrógenos, progestinas, andrógenos, tetrahidrodesoxicaricosterona; compuestos inmunoactivos tal como inmunosupresores, por ejemplo, pirimetamina, trimetoterina, penicilamina, ciclosporina, azatioprina; e inmunoestimulantes, por ejemplo, levamisol, dietil ditiocarbamato, encefalinas, endorfinas; compuestos antimicrobianos tal como antibióticos, por ejemplo, beta-lactama, penicilina, cefalosporinas, carbapenimas y monobactamas, inhibidores de beta-lactamasa, aminoglicósidos, macrólidos, tetraciclinas, espectinomicina; antimalarios, amebicidas; antiprotozooarios, antifúngicos, por ejemplo, anfotericina-beta, antivirales, por ejemplo, aciclovir, idoxuridina, ribavirina, trifluridina, vidarbina, ganciclovir; parasitidas; antihalminticos; radiofarmacéuticos; fármacos gastrointestinales; compuestos hematológicos; inmunoglobulinas; proteínas coagulantes de 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 que actúan centralmente, por ejemplo, metildopa, metildopa HCl; vasodilatadores directos antihipertensivos, por ejemplo, diazóxido, hidralazina HCl; fármacos que afectan el sistema

de renina-angiotensina; vasodilatadores periféricos, por ejemplo, fentolamina; fármacos antianginales; glicósidos cardíacos; inodilatadores, por ejemplo, amrinona, milrinona, enoximona, fenoximona, imazodan, sulmazol; antibirítmicos; bloqueadores de entrada de calcio; fármacos que afectan los lípidos sanguíneos, por ejemplo, ranitidina, bosentán, rezulina; fármacos respiratorios; fármacos simpatomiméticos, por ejemplo, albuterol, mesilato de bitolterol, dobutamina HCl, dopamina HCl, efedrina sódica (So), epinefrina, fenfluramina HCl, isoproterenol HCl, metoxamina HCl, bitartrato de norepinefrina, fenilefrina HCl, ritodrina HCl; fármacos colinomiméticos, por ejemplo, acetilcolina HCl; anticolinesterasas, por ejemplo, cloruro de edrofonio (Cl); reactivadores de colinesterasa; fármacos bloqueadores 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, bromuro de clinidio (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, baclofén; neurotransmisores y agentes neurotransmisores, por ejemplo, acetilcolina,

adenosina, trifosfato de adenosina; neurotransmisores de aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos excitatorios, GABA, glicina; neurotransmisores de amina biogénicos, por ejemplo, dopamina, epinefrina, histamina, norepinefrina, octopamina, serotonina, tiramina; neuropéptidos, óxido nítrico; fármacos antiparkinson, por ejemplo, amaltidina HCl, mesilato de benztropina, carbidopa; fármacos diuréticos, por ejemplo, diclorfenamida, metazolamida, bendroflumetiazida, politiazida; fármacos antimigraña, por ejemplo, mesilato de trometamina carboprost, o maleato de metisergida, o un derivado funcional de los mismos.

[000260] En algunos casos, la carga útil es una enzima tal como hialuronidasa, estreptocinasa, activador de plasminógeno de tejido, urocinasa, PGE-adenosina desaminasa; anestésicos intravenosos tal como droperidol, etomidato, citrato de fetanilo/droperidol, hexobarbital, cetamina HCl, metohexital Na, tiamilal Na, tiopental Na; antiepilépticos, por ejemplo, carbamazepina, clonazepam, divalproex Na, etosuximida, mefeniloína, parametadiona, feniloína, primidona. En varias modalidades, la carga útil biológicamente activa es una enzima seleccionada de hialuronidasa, estreptocinasa, activador de plasminógeno de tejido, urocinasa o una PGE-adenosina desaminasa.

[000261] La Tabla 8 muestra las secuencias de aminoácidos de las cargas útiles terapéuticas ejemplares proporcionadas en

la presente.

Tabla 8 - Secuencias de Aminoácidos de las Cargas Útiles Terapéuticas Ejemplares

SEQ ID NO	**Secuencia**
SEQ ID NO: 141	MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNF QQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQ VLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 142	APISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLF HGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSN RLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSL RNACI
SEQ ID NO: 143	MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKL FHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLS NRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMS LRNACI
SEQ ID NO: 144	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA FSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEV MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQ VKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
SEQ ID NO: 145	SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLL LKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSL GENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMS EFDIFINYIEAYMTMKIRN
SEQ ID NO: 146	FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQN PQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLR SVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQ TYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGS CGF

SEQ ID NO: 190	MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQ NPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFL RSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFK QTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEG SCGF
SEQ ID NO: 195	H-HisGlyGluGlyThrPheThrSerAspLeuSerLysGlnMetGluGl uGlu AlaValArgLeuPheIleGluTrpLeuLysAsnGlyGlyProSerSe rGlyAla ProProProSer-NH_2

IV. Espaciador

[000262] Un vehículo se puede acoplar a una carga útil heteróloga a través de un espaciador. Un espaciador proporcionado en la presente puede proporcionar flexibilidad estérica, plegado preciso y/o actividad biológica apropiada y función de tanto el vehículo como la carga útil.

[000263] Un espaciador puede comprender uno o más residuos de aminoácidos. En algunos casos, el espaciador es un espaciador basado en aminoácidos. Este espaciador puede comprender, consistir esencialmente de, o consta de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 35, 50, 75, o 100 residuos de aminoácidos. En algunos casos, un espaciador comprende, consta esencialmente de, o consta de como máximo aproximadamente 30, 25, 20, 15, o 10 residuos de aminoácidos. En algunos casos, la mayoría (por ejemplo, más de 90%) de

estos residuos de aminoácidos son residuos de glicina y/o serina.

[000264] Un espaciador puede ser un espaciador escindible o no escindible. En algunos casos, un espaciador escindible se puede escindir por una enzima, por ejemplo, una proteasa. Un espaciador no escindible no puede ser escindible por esta enzima. Por ejemplo, un espaciador no escindible se puede usar en casos donde las concentraciones sistémicas más altas de una carga útil son un objetivo.

[000265] Un espaciador puede comprender una o más repeticiones de secuencias de oligopéptidos de glicina-serina. De esta manera, en algunos casos, un vehículo comprende, consta escencialmente de, o consta de la secuencias de aminoácidos $(GS)_x$ (SEQ ID NO: 169), $(GGS)_x$ (SEQ ID NO: 170), $(GGGS)_x$ (SEQ ID NO: 171), $(GGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 172), o $(GGGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 173), en donde x = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15. En algunos casos, un espaciador comprende, consta escencialmente de, o consta de la secuencia de aminoácidos $(GGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 174), en donde x = 1, 2, 3, 4 o 5. En estos casos, un espaciador puede constar de 5, 10, 15, 20, o 25 aminoácidos.

[000266] Ejemplos de espaciadores proporcionados en la presente son aquellos que comprenden, que constan esencialmente de, o que constan de una secuencia de aminoácidos que tienen al menos 50%, 75%, 90%, o 99% de

identidad de secuencia a GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 175), GGGGSGGGGSGGGG (SEQ ID NO: 176), o GGGGSNLQGGLRQPR (SEQ ID NO: 177), un fragmento de cualquiera de los anteriores, o una combinación de cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, el espaciador consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 196 (GGGGS) o SEQ ID NO: 197 (GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS). En algunos casos, cualquiera del espaciador anterior puede comprender un residuo de glicina o serina adicional en ya sea la N y/o C-terminal.

[000267] En algunas modalidades, un espaciador que acopla un vehículo a una carga útil terapéutica comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 50%, 75%, 90%, o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 175-176.

V. Constructos de suministro

[000268] Se proporcionan en la presente constructos de suministro (por ejemplo, un complejo de vehículo-carga útil) que puede comprender un vehículo acoplado a una carga útil heteróloga. Un vehículo se puede acoplar a esta carga útil covalente o no covalentemente (por ejemplo, a través de interacciones iónicas, interacciones π-π, etc.). Un vehículo se puede acoplar directa o indirectamente a una carga útil heteróloga.

[000269] Una carga útil heteróloga se puede acoplar a una N y/o C-terminal de un vehículo. En algunos casos, una carga

útil heteróloga se acopla directa y covalentemente a una C-terminal de un vehículo al formar un unión de amida covalente entre el grupo carboxilo C-terminal del vehículo y la amina N-terminal de la carga útil heteróloga. En algunos casos, una carga útil heteróloga se acopla indirecta y covalentemente al vehículo a través de un espaciador.

[000270] De esta manera, en algunos casos, cuando un vehículo se acopla covalentemente a una carga útil, el constructo de suministro puede ser presentado de acuerdo con la Fórmula II: C-S-P o Fórmula III: P-S-C, en donde C es un vehículo, S es un espaciador, u opcionalmente una unión, y P es una carga útil heteróloga. Un constructo de suministro puede comprender además una o más modificaciones en su N-terminal y/o C-terminal. Estas modificaciones pueden incluir un residuo de metionina N-terminal. De esta manera, la Fórmula II y la Fórmula III también pueden incluir una metionina N-terminal (por ejemplo, M+C-S-P) o (por ejemplo, M+P-S-C).

[000271] Un vehículo se puede acoplar a una carga útil heteróloga a través de conjugación química/sintética (por ejemplo, usando reacciones de acoplamiento de amida) o por expresión recombinante en una célula bacteriana (por ejemplo, en *E. coli*) o de mamífero (por ejemplo, Ovario de Hámster Chino (CHO)) como una proteína de fusión.

[000272] Un constructo de suministro, o parte del mismo (por

ejemplo, el vehículo y/o espaciador, puede ser un polipéptido. El término "polipéptido", como se usa en la presente, puede incluir tanto aminoácidos naturales como no naturales.

[000273] Los constructos de suministro proporcionados en la presente pueden pasar a través de las células epiteliales polarizadas con una velocidad de flujo alta a través de una o más interacciones de afinidad moderada, dinámicas de capacidad alta y/o dependientes de pH del vehículo con uno o más socios de interacción similar al receptor de transporte (TRIP). Estos TRIP pueden ser elementos de las rutas de tráfico endógenas, y como tal, pueden permitir que un vehículo transporte la carga útil heteróloga a través de la barrera de células epiteliales sin deteriorar la barrera misma y sin alterar significativamente (por ejemplo, modificar química/enzimáticamente) el vehículo o la carga útil.

[000274] Además, las interacciones con TRIP pueden permitir que un transvehículo transporte una carga útil a través de un epitelio intacto (por ejemplo, un epitelio intestinal polarizado) con velocidades de transporte de al menos aproximadamente 10^{-6} cm/seg, 10^{-5} cm/seg, o 10^{-4} cm/seg.

[000275] En algunos casos, un vehículo se acopla indirecta y no covalentemente a una carga útil. En algunos casos, las nanopartículas (por ejemplo, liposomas, nanopartículas

metálicas, nanopartículas basadas en polímero, etc.) se pueden cargar en (por ejemplo, en el interior y/o sobre la superficie de la partícula) con las moléculas de carga útil (por ejemplo, IL-10, IL-22, GLP-1, etc.), y moléculas de vehículo derivadas de Cholix se pueden acoplar a estas nanopartículas (por ejemplo, sobre su superficie). En algunos casos, una relación de carga útil al vehículo puede ser al menos aproximadamente 15000:1, 10000:1, 5000:1, 2500:1, 1000:1, 500:1, 250:1, 100:1, 50:1, 25:1, 10:1, 5:1, 2,5:1, 1:1. Esto puede permitir el transporte de estas nanopartículas que contienen carga útil en o a través de las células epiteliales polarizadas (por ejemplo, células epiteliales intestinales polarizadas) usando los vehículos derivados de Cholix unidos a la superficie. En algunos casos, una nanopartícula puede liberar la carga útil después de la transcitosis o la administración intracelular. En casos donde la nanopartícula se transporta a través de las células epiteliales, la carga útil liberada puede unirse a los receptores dentro del tejido de la sub-mucosa (por ejemplo, *lamina propria*) y/o pueden entrar a la circulación sistémica y de esta manera proporcionan una cierta función (por ejemplo, una función terapéutica o de diagnóstico) sistémicamente. En otros casos, donde una nanopartícula libera la carga útil dentro de una célula epitelial, la carga útil (por ejemplo, un ácido nucleico) puede proporcionar

ciertas funciones intracelulares, por ejemplo, producción de transgenes dentro de estas células, modulación de la expresión génica, etc.

Constructos de suministro Ejemplares

[000276] En varias modalidades, un constructo de suministro o complejo de vehículo-carga útil comprende (a) un vehículo que comprende un polipéptido de Cholix que no comprende SEQ ID NO: 179, y no consta de SEQ ID NO: 126, formado en complejo con (b) una carga útil heteróloga, en donde el vehículo es capaz de (i) pasar la carga útil heteróloga a través de una célula epitelial polarizada; o (ii) transportar la carga útil heteróloga a la célula epitelial polarizada.

[000277] En algunas modalidades, un constructo de suministro comprende un vehículo derivado de Cholix que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a los residuos de aminoácidos 1-386 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 o 2.

[000278] En algunas modalidades, un constructo de suministro comprende un vehículo derivado de Cholix que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a los residuos de aminoácidos de cualquiera de las posiciones 1-40 a cualquiera de los residuos de aminoácidos en la posiciones 150-347 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:

1. En algunos casos, este vehículo comprende, consta escencialmente de, o consta de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a los residuos de aminoácidos de las posiciones 1-151, 1-187, 41-187, 1-206, 1-245, 1-251, o 1-266 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1. En otros casos, un vehículo comprende, consta escencialmente de, o consta de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a los residuos de aminoácidos de las posiciones 1-151, 1-187, 41-187, 1-206, 1-245, 1-251, o 1-266 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

[000279] Cualquiera de estos vehículos se puede acoplar a una carga útil terapéutica que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 141, 142, 144, 145, y 146.

[000280] Esta carga útil terapéutica se puede acoplar a un vehículo derivado de Cholix a través de un espaciador que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de al menos 66%, 73%, 80%, 86%, 93%, o 100% de identidad de secuencia a las secuencias de aminoácidos GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 175).

[000281] De esta manera, en algunos casos, un constructo de suministro comprende un vehículo que comprende, que consta

escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 134 acoplada a un espaciador a una carga útil terapéutica que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 142. En algunos casos, el espaciador comprende, consta escencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 66%, 73%, 80%, 86%, 93%, o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 175.

[000282] En otros casos, un constructo de suministro comprende un vehículo que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 135 acoplada a través de un espaciador a una carga útil terapéutica que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 142. En algunos casos, el espaciador comprende, consta escencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 66%, 73%, 80%, 86%, 93%, o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 175.

[000283] En algunos casos, un constructo de suministro

comprende un vehículo que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 134 a través de un espaciador que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 66%, 73%, 80%, 86%, 93%, o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 175 a una carga útil terapéutica. Esta carga útil terapéutica puede ser una citocina, una hormona, un anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión funcional del mismo. En algunos casos, la carga útil terapéutica comprende, consta escencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 145, o SEQ ID NO: 146.

[000284] En algunos casos, un constructo de suministro comprende un vehículo que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 135 a través de un espaciador que comprende, que consta escencialmente de, o que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 66%, 73%, 80%, 86%, 93%, o 100% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 176 a una carga útil terapéutica. Esta carga útil terapéutica puede ser una citocina, una hormona, un

anticuerpo terapéutico o un fragmento de unión funcional del mismo. En algunos casos, la carga útil terapéutica comprende, consta escencialmente de, o consta de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, o 99% de identidad de secuencia a SEQ ID NO: 145.

[000285] En algunos casos, un constructo de suministro comprende, consta escencialmente de, o consta de al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de secuencia a las secuencias de aminoácidos expuesta en cualquiera de SEQ ID NO: 147-150, 152-159, o 188.

[000286] En algunas modalidades, un constructo de suministro consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 147.

[000287] En algunas modalidades, un constructo de suministro consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 149.

[000288] En algunas modalidades, un constructo de suministro consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 188.

[000289] Las secuencias de aminoácidos de los constructos de suministro ejemplares se muestran en la presente en la Tabla 9.

Tabla 9 – Secuencias de Aminoácidos de los Constructos de suministro Ejemplares

SEQ ID NO	Secuencia
SEQ ID NO: 147	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPY ITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLE EVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDT VKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 148	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLS CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAGGGGSGGGGSGGG GSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFH GVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLST CHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 149	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLS CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAGGGGSGGGGSGGG GSPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMKDQLDNLLLK

	ESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLK TLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINY IEAYMTMKIRN
SEQ ID NO: 150	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSNLQGGLRQPRFPTIPLSRLFDNAMLRAH RLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQ QKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLE EGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRK DMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 151	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELGGGGSGGGGSGGGGS FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQT SLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANS LVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNS HNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 152	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLI QSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSP RTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCR SVEGSCGF
SEQ ID NO: 153	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT

	KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAGGGGSGGGGSGG GGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQN PQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVF ANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFD TNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 154	MVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRN IIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAGG GGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIP KEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWL EPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQ IFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEG SCGF
SEQ ID NO: 155	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLAGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTY QEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRI SLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRL EDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLR IVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 156	MGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV IHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQR NIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA QKEGSRHKRWAHWHTGLGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAH RLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQ QKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLE EGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRK

	DMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFHHHHHH
SEQ ID NO: 157	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVGGGG SGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKE QKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEP VQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIF KQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSC GF
SEQ ID NO: 158	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEE AYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLI QSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSP RTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCR SVEGSCGF
SEQ ID NO: 159	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFDNAMLRAH RLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQ QKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLE EGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRK

	DMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 188	MLEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPY ITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLE EVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDT VKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 198	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAK EASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRF QPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEI KAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 199	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK

	QGIEQKPVEQRIHFSKGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAPISSHCR LDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYL MKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 200	MAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHG VSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTC HIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACIGGG GSVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTI NDEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENG TKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYS IDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW AHWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITV KQGIEQKPVEQRIHFSKG
SEQ ID NO: 201	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTIN DEQNDIKDEDKGESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGT KTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA HWHTGLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVK QGIEQKPVEQRIHFSKGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLS CAYQAQNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINEN NPGMVTQVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAGGGGSAPISSHCR LDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYL MKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHI QRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI

VI. Métodos de uso

[000290] Se proporcionan en la presente, en algunas modalidades, constructos de suministro que comprenden un vehículo acoplado a una carga útil heteróloga. Los vehículos

proporcionados en la presente se pueden usar para transportar esta carga útil (por ejemplo, una carga útil terapéutica) a varias ubicaciones dentro de una célula epitelial tal como el lado apical (por ejemplo, un sistema de reciclaje apical), el lado basal, y/o compartimiento supranucleares. La administración a través de un epitelio intestinal polarizado puede incluir la administración a los compartimientos de la submucosa (por ejemplo, *lamina propria* y/u otros compartimientos intestinales de la submucosa) y/o circulación sistémica (por ejemplo, a través del sistema portal hepático).

A. Métodos de tratamiento

[000291] Las capacidades de alto transporte de flujo de los vehículos proporcionados en la presente a través de las barreras epiteliales intactas (por ejemplo, un epitelio intestinal polarizado) se pueden usar para administrar moléculas de carga útil terapéuticas y/o de diagnóstico a un sujeto en necesidad del mismo (por ejemplo, un humano o un roedor). Por ejemplo, la administración de la carga útil terapéutica a los compartimientos de la submucosa, por ejemplo, la *lámina propria*, puede permitir el tratamiento y/o diagnosis de enfermedades o afecciones situadas en y/u originadas de estas ubicaciones en el tracto GI, mientras que la administración sistémica de la carga útil se puede usar para proporcionar concentraciones terapeutamente eficaces en

varias células, tejidos, u órganos dentro de un organismo.

[000292] Las enfermedades que se pueden tratar usando un constructo de suministro de esta descripción que se pueden incluir de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedades metabólicas, enfermedades neurodegenerativas, y enfermedades neurológicas, enfermedad viral o infecciones, y enfermedad cardiovascular.

[000293] En algunos casos, la enfermedad inflamatorio puede incluir intestinal inflamatoria, psoriasis, septicemia bacteriana, enfermedad de Crohn (por ejemplo, enfermedad de Crohn fistulante), colitis ulcerativa (por ejemplo, colitis ulcerativa moderada grave o colitis ulcerativa leve a moderada), colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis de diversión, síndrome de Behcet, colitis indeterminada, pancreatitis, inflamación hepática (por ejemplo, un hepatitis), pouchitis, proctitis, y lesión de células epiteliales.

[000294] En algunos casos, la enfermedad autoinmune puede incluir lupus eritematoso sistémico (SLE), pénfigo vulgar, miastenia grave, anemia hemolítica, purpura trombocitopenia, enfermedad de Grave, enfermedad de Sjögren, dermatomiositis, enfermedad de Hashimoto, polimiositis, esclerosis múltiple, diabetes mellitus, artritis reumatoide y esclerodermia.

[000295] En algunos casos, el cáncer puede incluir linfomas no de Hodgkin (NHL), linfoma de Hodgkin, leucemia linfocítica

crónica, leucemia de células capilares, leucemia linfoblástica aguda, mieloma múltiple, carcinomas de la vejiga, riñón, ovario, cuello uterino, mama, pulmón, o cáncer nasofaríngeo, melanoma maligno, NHL resistente a rituximab, y leucemia.

[000296] En algunos casos, el trastorno metabólico puede incluir diabetes, diabetes como una secuencia de obesidad, hiperglicemia, dislipidemia, hipertrigliceridemia, síndrome X, resistencia a la insulina, tolerancia a la glucosa deteriorada (IGT), dislipidemia diabética, hiperlipidemia, enfermedad de hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica, obesidad, tolerancia a la glucosa deteriorada, glucosa en ayunas elevada, resistencia a la insulina, secreción de albúmina urinaria, obesidad central, hipertensión, triglicéridos elevados, colesterol LDL elevado y/o colesterol HDL reducido, hiperglicemia, hiperinsulinemia, dislipidemia, cetosis, hipertrigliceridemia, síndrome X, resistencia a la insulina, glucosa en ayunas deteriorada, tolerancia a la glucosa deteriorada (IGT), dislipidemia diabética, gluconeogénesis, glicogenolisis en exceso, cetoacidosis diabética, hipertrigliceridemia, hipertensión, nefropatía diabética, insuficiencia renal, fallo renal, hiperfagia, pérdida muscular, neuropatía diabética, retinopatía diabética, coma diabético, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad de la arteria periférica e

hiperlipidemia.

[000297] En algunos casos, la enfermedad cardiovascular puede incluir enfermedad vascular, enfermedad cardíaca, y apoplejía.

[000298] Otras enfermedades y condiciones que se pueden tratar usando un constructo de suministro de esta descripción pueden incluir deficiencia de la hormona de crecimiento (GHD), síndrome de Turner (TS), síndrome de Noonan, síndrome de Prader-Willi, deficiencia del gen que contiene la homosecuencia de estatura corta (SHOX), insuficiencia renal crónica, estatura corta idiopática, síndrome de intestino corto, alergia, enfermedad de injerto versus hospedero, anemia, trastornos de células hematopoyéticas, y enfermedades del sistema endocrino o sistemas reproductores.

[000299] Además, un constructo de suministro se puede administrar como una composición farmacéutica a un sujeto en necesidad del mismo. Un constructo de suministro en la presente se puede formular en una composición farmacéutica para eficacia terapéutica incrementada. Por ejemplo, un constructo de suministro se puede formular tal que está siendo liberado en ubicaciones específicas en o alrededor del tracto GI de un sujeto. En algunos casos, un constructo de suministro se puede formular para incrementar su actividad bilógica para acoplar las células inmunes en las diversas partes en o alrededor del tracto GI, tal como el íleo.

[000300] Un constructo de suministro se puede administrar a través de varias vías de administración. En algunos casos, la administración incluye administración oral del constructo de suministro. En algunos casos, un constructo de suministro se administra oralmente como una tableta o una cápsula.

B. Métodos Experimentales

[000301] Se proporcionan métodos en la presente para prueba de transcitosis y evaluación de proteínas que interactúan con el vehículo de Cholix (por ejemplo, TRIP).

1. Prueba de Transcitosis

[000302] La función de transcitosis de los constructos de suministro aislados se puede probar como una función de la estabilidad del constructo de suministro para pasar a través de una membrana epitelial (por ejemplo, un epitelio intestinal polarizado) a través de transcitosis. La actividad de transcitosis del constructo de suministro se puede probar por cualquier método conocido por uno de experiencia en la técnica, sin limitación. En varias modalidades, la actividad de transcitosis se puede probar al evaluar la capacidad de un constructo de suministro para entrar a una célula no polarizada a la cual se une. En casos de un vehículo derivado de Cholix, y sin que se proponga ser limitado sin ninguna teoría particular o mecanismo de acción, se describe en la presente que la función de transcitosis que permite que un constructo de suministro pase a través de una célula

epitelial polarizada y que la función para entrar a las células no polarizadas reside en el mismo dominio o región, es decir, los residuos de aminoácidos 1266 de SEQ ID NO: 1. De esta manera, la capacidad del constructo de suministro para entrar a la célula se puede evaluar, por ejemplo, al detectar la presencia física del constructo en el interior de la célula. Por ejemplo, el constructo de suministro se puede etiquetar con, por ejemplo, un marcador fluorescente, y el constructo de suministro expuesto a la célula. Entonces, las células se pueden lavar, remover cualquier constructo de suministro que no ha enterado a la célula, y la cantidad de etiqueta que permanece en la célula se puede determinar. La detección de la etiqueta dentro de estas células, por ejemplo, usando microscopia, indica que el constructo de suministro ha entrado a la célula.

[000303] La capacidad de transcitosis del constructo de suministro se puede probar al evaluar la capacidad de un constructo de suministro para pasar a través de una célula epitelial polarizada. Por ejemplo, el constructo de suministro se puede etiquetar con, por ejemplo, un marcador fluorescente (por ejemplo, RFP) y hacer contacto con las membranas apicales de una capa de las células epiteliales. En otro ejemplo, el constructo de suministro se puede detectar usando anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales y/o policlonales) dirigidos contra el constructo de suministro, o

una porción del mismo tal como un derivado de Cholix o carga útil. La fluorescencia detectada en el lado basolateral de la membrana formada por las células epiteliales (por ejemplo, una cámara basolateral como se ilustra en la Figura 1 o la lámina propria en los experimentos *in vivo*) indica que las capacidades de transcitosis del vehículo están intactas.

[000304] La transcitosis *in vivo* se puede probar usando ratas Wistar machos. Las ratas Wistar machos se pueden alojar 35 por jaula con un ciclo de 12/12 horas luz/oscuridad y pueden ser de 225275 g (aproximadamente 68 semanas de edad) cuando se colocan en el estudio. Los experimentos se pueden conducir durante la fase de luz usando un protocolo no de recuperación que usa anestesia con isofluorano continuo. Se puede conducir en una incisión abdominal de línea media de 45 cm que expone las regiones del yeyuno medio. Se pueden preparar soluciones madre a $3.86x10^{-5}$ M de los artículos de prueba en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), con 50 µL (por 250 g de rata) que se administran por inyección intraluminal (ILI) usando una aguja de calibre 29. El mesenterio del sitio de la inyección entonces se puede marcar con un marcador permanente. En la terminación del estudio, una región de 3-5 mm que capturó el segmento del intestino marcado se puede aislar y procesar para evaluación microscópica. Los experimentos *in vivo* se pueden llevar a cabo de acuerdo con the U.K. Animals (Scientific Procedures)

Act of 1986, the European Communities Council Directive of 1986 (86/609/EEC), and the University of Bath's ethical review procedures.

2. Evaluación de las Proteínas de Interacción del vehículo de Cholix (es decir, TRIP)

[000305] A fin de identificar los socios de interacción Cholix (por ejemplo, receptores, enzimas, etc.) y establecer los compartimientos vesiculares donde interactúan con los polipéptidos de Cholix (por ejemplo, residuos 1266 de una secuencia de Cholix o una versión truncada de la misma), se puede llevar a cabo una serie de ensayos desplegables para identificar los socios de interacción potencial que pueden ser seguidos por asociaciones *in silico* usando resonancia de plasmones superficiales, estudios de transcitosis *in vitro* usando células epiteliales intestinales humanas Caco-2 polarizadas donde el silenciamiento genético de las dianas específicas se puede lograr, y estudios de transcitosis *in vivo* donde los elementos Cholix y los receptores específicos se pueden co-localizar en las estructuras vesiculares establecidas. Sin que se límite sin ninguna teoría, se asume que un proceso de transcitosis puede implicar elementos que se restringen normalmente dentro de los elementos vesiculares específicos de las células epiteliales intestinales polarizadas pero se pueden reclutar o "secuestrar" por, por ejemplo, vehículos derivados de Cholix, para dejar el

endosoma tardío y evitar la degradación lisosomal después de la liberación de la célula en un compartimiento basolateral (por ejemplo, a través de mecanismos de reciclaje apicales, exocitosis mediada por receptor apical, etc.).

3. Medición de la co-localización de los vehículos con proteínas celulares

[000306] La co-localización de un vehículo o complejo de vehículo-carga útil descrito en la presente con una o más proteínas celulares se puede determinar por microscopia de fluorescencia. Por ejemplo, un vehículo derivado de Cholix se puede aplicar a la membrana apical de las células epiteliales polarizadas (por ejemplo, Caco-2) o al tejido epitelial intestinal. Después de la endocitosis mediada por receptor, la actualización del vehículo en las células se puede determinar por microscopia de fluorescencia, por ejemplo, al usar anticuerpos anti-vehículo de Cholix etiquetados o vehículos etiquetados con tinte, o al usar anticuerpos anti-carga útil. Las muestras o secciones de tejidos se pueden inmunotransferir adicionalmente con marcadores específicos para proteínas celulare4s tal como Rab7, Rab11, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 7. Entonces se pueden usar varias técnicas de análisis de imágenes para determinar la posición relativa del vehículo a la proteína celular (ver por ejemplo, Ejemplo 6).

EJEMPLOS

[000307] Los siguientes ejemplos ilustran simplemente la descripción y no se proponen para limitar la descripción de ninguna manera.

EJEMPLO 1

Producción de Constructos de suministro derivados de Cholix

[000308] En este Ejemplo, se describe la preparación de un constructo de suministro como una secuencia de aminoácidos individual que comprende una secuencia de vehículo de Cholix, una secuencia espaciadora, y una carga útil terapéutica.

[000309] Primero, el gen del constructo de suministro se amplificó por PCR, incorporando parares de enzimas de restricción de los 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 enzimática de restricción, los productos de PCT se clonaron en un plásmido apropiado para la expresión celular, que se digirió con los pares de enzimas de restricción correspondientes. El constructo resultante comprendió de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 147 y también se etiquetó con un motivo 6-His en la N-terminal de la proteína para facilitar la purificación. Los plásmidos finales se verificaron por digestiones de enzima de restricción y secuenciación de ADN.

[000310] Los constructos de suministro se expresaron como sigue: Los constructos de suministro se expresaron como sigue: células competentes BL21(DE3) pLysS de *E. Coli*

(Novagen, Madison, Wis.) se transformaron usando un método de choque térmico estándar en presencia del plásmido apropiado para generar las células de expresión del constructo de suministro, seleccionadas en el medio que contiene ampicilina, y se desarrollaron en caldo Luria-Bertani (Difco; Becton Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) con antibiótico, después se indujeron para la expresión de proteínas por la adición de isopropil-D-tiogalactopiranosido 1 mM (IPTG) a OD 0,6. Dos horas después de la inducción IPTG, las células se recolectaron por centrifugación a 5,000 rpm durante 10 minutos. Los cuerpos de inclusión se aislaron después de la lisis celular y las proteínas se solubilizaron en amortiguador que contiene Tris-HCl 100 (pH 8.0), EDTA 2 mM, guanidina HCl 6 M, y ditiotreitol 65 mM. El constructo de suministro solubilizado se volvió a plegar en presencia de Tris 0,1 M, pH=7,4, L-arginina 500 mM, GSSG 0,9 mM, EDTA 2 mM. La proteína replegada (SEQ ID NO: 147) se purificó por Intercambio de Iones Q sepharose y cromatografía de Filtración en Gel Superdex 200 (Amersham Biosciences, Inc., Sweden). La pureza de las proteínas se evaluó por SDS-PAGE y HPLC analítica (Agilent, Inc. Palo Alto, Calif.).

[000311] El constructo de suministro se evaluó para verificar el plegamiento apropiado con respecto a su tamaño molecular anticipado. Después de la inducción, la proteína expresada se recolectó de cuerpos de inclusión. El grado de

expresión del constructo de suministro se verificó por inmunotransferencia de western, y el peso molecular evidente se comparó con la masa calculada.

[000312] Los resultados mostraron producción estable y eficiente del constructo de suministro funcional en alto rendimiento y pureza.

EJEMPLO 2

Modelo *In Vitro* para la Evaluación del Transporte a Través de las Monocapas de Células Epiteliales

[000313] Este ejemplo muestra un modelo *in vitro* diseñado para evaluar las propiedades de transporte de los constructos de suministro descritos en la presente.

[000314] La figura 1 muestra esquemáticamente una configuración que comprende una cámara apical arriba de una monocapa de células epiteliales y una cámara basal debajo de esta monocapa de células epiteliales.

[000315] Para la permeabilidad apical a basolateral, se agregaron artículos de prueba (por ejemplo, constructo de suministro, carga útil, etc.) al lado apical (A) y la cantidad de permeación se determinó en el lado basolateral (B). Para la permeabilidad del basolateral a apical, se agregaron artículos de prueba al lado basolateral (B) y la cantidad de permeación se determinó en el lado apical (A).

[000316] Los datos se pueden expresar como permeabilidad (P_{app}) de acuerdo con la siguiente ecuación: P_{app} = (dQ/dt)/

(C_0*A). Q/dt es una velocidad de permeación, C_0 es la concentración inicial del artículo de prueba, y A es el área de la monocapa. Una relación de transporte de flujo (R_e) se puede calcular de acuerdo con la siguiente ecuación: (R_e) = P_{app}(B-A)/P_{app}(A-B). R_e >2 puede indicar un sustrato potencial para P-gp u otros transvehículos de flujo activos.

[000317] Las células SMI-100 o Caco-2 se pueden usar para evaluar la función de transcitosis de un vehículo o constructo de suministro *in vitro*.

[000318] Para células Caco-2, se llevó a cabo un ensayo ELISA para evaluar la capacidad de un vehículo o constructo de suministro para moverse a través de las monocapas de células Caco-2 a través de la transcitosis. Las células Caco-2 (ATCC HTB-37^{MR}) se mantuvieron en CO_2 al 5% a 37°C en medio completo: medio de Eagle modificado de Dulbecco F12 (DMEM F12) complementado con 10% de suero bovino fetal, glutamina 2,5 mM, 100 U de penicilina/ml, y 100 g de estreptomicina/ml (Gibco BRL, Grand Island, N.Y.). Las células se alimentaron cada 2 a 3 días con este medio (medio completo designado) y se hicieron pasar cada 5 a 7 días. Para los ensayos, las células se sembraron en placas de 24 o 96 concavidades y se desarrollaron a confluencia.

[000319] Se desarrollaron células Caco-2 como monocapas confluentes en soportes transwell de membrana de

policarbonato de tamaño de poro de 0,4-μm recubiertas con colágeno (Corning-Costar, Cambridge, MA) y se usaron 1825 días después de lograr una resistencia eléctrica transepitelial (TER) de >250 ·cm2 como es medido usando un voltímetro Millicell-ERSMR (Millipore). El transporte apical a basolateral (AB) de un vehículo o constructo de suministro a través de estas monocapas se determinó al medir la cantidad de proteína transportada en ciertos puntos de tiempo (por ejemplo, 15, 30, y 45 minutos) después de por ejemplo aplicación apical de 4,7 nM, 23,6 nM y 236 nM del constructo de suministro a 37°C. Las mediciones TER y el grado de dextrano fluorescente 10 kDa (medido usando un protocolo de exclusión de tamaño a HPLC) se usaron para verificar las propiedades de la barrera de monocapa durante el curso del estudio. El grado de transporte del constructo de suministro se determinó por titulación del medio recolectado en el ensayo de citotoxicidad basado en células. El constructo de suministro transportado se midió por el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) usando los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo anti-vehículo o anti-carga útil, tal como anti-IL-22) para la captura y supresión.

[000320] Monocapas confluentes de los tejidos del intestino delgado humanos (SMI-100, MatTek Corporation; Ashland, MA, USA) establecidos en los insertos de cultivo celular se

dejaron estabilizar durante 24 horas a 37°C antes del uso. Solo los insertos que tienen una resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de > 400 Ω • cm^2 se consideraron que tienen integridad de monocapa suficiente para uso en los estudios. Una verificación secundaria de la integridad de la monocapa se llevó a cabo al evaluar la supresión del transporte de dextrano a 70 kD. Las cámaras se lavaron una vez con el amortiguador de transporte (PBS). Las móleculas de prueba (por ejemplo, constructos de suministro, cargas útiles, etc.), preparadas a una concentración de 20 µg/mL, se aplicaron a la superficie apical de insertos en volúmenes de 100 µL. Los volúmenes basolaterales de 500 µL PBS se reemplazaron en cada punto de tiempo para estudios de transporte. Cada condición experimental se llevó a cabo en triplicado.

EJEMPLO 3

Transporte Mediado por vehículo de IL-22 a Través de Células Epiteliales Intestinales Polarizadas

[000321] Este ejemplo muestra que un vehículo de SEQ ID NO: 134 puede transportar una carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 142) a través de las células epiteliales intestinales polarizadas *in vitro*. Este ejemplo muestra además que el vehículo con SEQ ID NO: 134 puede transportar una carga útil de IL-22 biológicamente activa a través de las células epiteliales intestinales polarizadas y a la *lamina propria in*

vivo.

[000322] El transporte del constructo de suministro (SEQ ID NO: 147) a través de las monocapas de células Caco-2 y el tejido epitelial del intestino delgado (también referido en la presente como SMI-100) se probó al aplicar el constructo de suministro a la membrana apical de las células epiteliales, de acuerdo con el Ejemplo 2 y como se ilustra en la Figura 1 para el transporte apical (A) a basal (B). Los experimentos se ejecutaron en triplicado y las muestras de la cámara basolateral se recolectaron a 15, 30, y 45 minutos después de la aplicación apical para determinar la cantidad de proteína transportada. La cantidad de proteína transportada se midió usando los ensayos ELISA.

[000323] Los datos en la figura 2 y la figura 3 muestra que un vehículo con SEQ ID NO: 134 cuando se acopló a IL-22, dio por resultado el transporte de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 142) a través de tanto Caco-2 (figura 2) como SMI-100 PF (figura 3) en una manera dependiente de tiempo, y que el constructo de suministro dio por resultado aproximadamente 2-3 veces más IL-22 que cruzar las células epiteliales cuando se compara a una IL-22 (SEQ ID NO: 143) que no se acopló a un vehículo.

[000324] Para los experimentos *in vivo*, se probó la transcitosis usando ratas Wistar machos. Las ratas Wistar machos se alojaron 3-5 por jaula con un ciclo 12/12 h de

luz/oscuridad y fueron de aproximadamente 225-275 g (aproximadamente de 6-8 semanas de edad) cuando se colocaron en el estudio. Los experimentos se condujeron durante la fase de luz usando un protocolo no de recuperación que usa anestesia de isofluorano continua. Se condujo a una incisión abdominal de línea media de 4-5 cm que expuso las regiones del yeyuno medio. Se prepararon soluciones madre a $3,86x10^{-5}$ M del constructo de suministro en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), con 50 L (por 250 g de rata) que se administraron por inyección intraluminal (ILI) usando una aguja de calibre 29. El mesenterio del sitio de inyección entonces se marcó con un marcador permanente. En la terminación del estudio, una región de 3-5 mm que capturó el segmento del intestino marcado se aisló y se procesó para evaluación microscópica.

[000325] Los resultados de la actividad de transcitosis del constructo de suministro con SEQ ID NO: 147 se muestran en la figura **4**, mostrando que las cantidades significativas de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 142) cruzó un epitelio intestinal intacto y polarizado *in vivo* cuando se proporcionó como parte de un constructo de suministro que incluye un vehículo derivado de Cholix. Esta imagen de microscopio muestra el transporte de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 142) del sitio apical del epitelio intestinal (resaltado por la flecha blanca #1) al sitio basal de las células

epiteliales y dentro en la *lamina propria* (3) (abreviado como "1.p.") después de la aplicación luminal del constructo de suministro de SEQ ID NO: 147 al yeyuno de ratas Wistar. La imagen muestra además que la IL-22 interactuó y se unió a un grado significativo a los receptores de IL-22 situados en las células dentro de la *lamina propria* y en la membrana basal exterior del epitelio polarizado (resaltado por flechas blancas #2), mostrando que la carga útil de IL-22 fue biológicamente activa después del transporte. La localización de IL-22 se indica por las flechas blancas y la fluorescencia verde, la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI.

[000326] Además, la figura 5 muestra que los constructos de suministro que constan de las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NO: 147 y SEQ ID NO: 148 se detectaron en el compartimento basolateral después de la transcitosis. El análisis de los experimentos de inmunotransferencia Western confirman que no se alteraron los conceptos de suministro.

[000327] Los experimentos de seguimiento también mostraron la transcitosis de los constructos de suministro que comprenden un vehículo derivado de Cholix que puede depender de la presencia tanto de GRP75 (Figura 6) como la proteína de núcleo de proteoglicano de sulfato de heparan específica de membrana basal (HSPG) (Figura 7) (también referido en la presente como "perlecan"). La figura 6 y figura 7 muestran

que la función de transcitosis se redujo significativamente en las células Caco-2 que carecieron de GRP75 (Figura 6, es decir, células Caco-2^{GRP75-}) y HSPG (Figura 7, es decir, células Caco-2^{HSPG-}), respectivamente. Esto indica que tanto GRP75 como HSPG son TRIP que un vehículo derivado de Cholix puede interactuar durante la transcitosis apical a basal.

[000328] Conjuntamente, estos datos muestran que los vehículos derivados de Cholix descritos en la presente transportan de manera eficiente (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 20%, 25%, o 50% del material aplicado a la superficie apical) de carga útil terapéutica tal como IL-22 a través de las capas epiteliales polarizadas, con velocidades de transporte significativamente incrementadas y eficiencia de transporte total (por ejemplo, al menos aproximadamente 2-3 veces de incremento) en comparación con la carga útil sola.

EJEMPLO 4

Estudios de Transporte *in vivo* en Células Epiteliales Polarizadas Usando los vehículos Derivados de Cholix

[000329] Este ejemplo muestra la capacidad de los vehículos derivados de Cholix truncados para transportar la carga útil a células epiteliales polarizadas.

[000330] La figura 8 representa la detección microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 154) en los compartimentos apicales (resaltados con la flecha blanca #2) dentro de las células epiteliales 15 minutos

después de la inyección intraluminal del constructo usando un modelo de inyección intraluminal de rata (flecha blanca #1 resalta la superficie apical, la flecha blanca #3 resalta la membrana basal, y la flecha blanca #4 resalta la *lamina propria*). Los datos muestran que el vehículo derivado de Cholix$^{41-187}$ (por ejemplo, SEQ ID NO: 137) es capaz de transportar la carga útil a los compartimentos apicales de las células epiteliales, pero no a través de las células epiteliales. La fluorescencia roja muestra la localización de un vehículo de Cholix, la fluorescencia verde muestra la localización de hGH (SEQ ID NO: 146), y la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI.

[000331] La figura 9 representa la supresión microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 156) en los compartimentos apicales (resaltados con la flecha blanca #2) de las células epiteliales 15 minutos después de la inyección intraluminal usando un modelo de inyección intraluminal de rata (flecha blanca #1 resalta la superficie apical, flecha blanca #3 resalta la membrana basal, y la flecha blanca #4 resalta la *lamina propria*). Los datos muestran que un vehículo derivado de Cholix$^{40-205}$ (SEQ ID NO: 138) es capaz de transportar la carga útil (por ejemplo, hGH) a los compartimentos apicales de las células epiteliales, pero no a través de las células epiteliales en la *lamina propria*. Estos datos sugieren además que los residuos 1-40 de

SEQ ID NO: 1 pueden desempeñar una función en la transcitosis pero puede no ser requerida para la endocitosis de un vehículo de Cholix. La fluorescencia roja muestra la localización de un vehículo de Cholix, la fluorescencia verde muestra la localización de hGH (SEQ ID NO: 146), y la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI.

[000332] La figura 8 representa la detección microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 153) en los compartimentos apicales dentro de las células epiteliales 5 minutos después de la inyección intraluminal del constructo de suministro al yeyuno de rata. En las figuras 10A-10C, la fluorescencia roja muestra la localización de un vehículo de Cholix, la fluorescencia verde muestra la localización de hGH (SEQ ID NO: 146), y la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI; la flecha blanca #1 resalta los compartimentos apicales, y la flecha blanca #2 resalta los compartimentos supranucleares.

[000333] La figura 10B representa la detección microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 153) 10 minutos después de la inyección intraluminal. Los datos muestran que el vehículo transportó la carga útil de hGH de los compartimientos apicales a los compartimientos supranucleares y basales a través del tiempo.

[000334] La figura 10C representa la detección microscópica de fluorescencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO:

153) 15 minutos después de la inyección intraluminal. Los datos muestran que el vehículo transportó la carga útil de los compartimientos apicales a los compartimientos supranucleares y basales a través del tiempo.

[000335] Estos datos muestran que los vehículos derivados de Cholix con os truncamientos C-terminales en la posición 187 o 205 de SEQ ID NO: 1, y un truncamiento N-terminal en las posiciones 40 o 41 de SEQ ID NO: 1, respectivamente, pueden transportar la carga útil en las células epiteliales polarizadas. Estos datos sugirieron además que los 39 aminoácidos N-terminales del vehículo de Cholix pueden desempeñar una función en la transcitosis pero no son suficientes para el transporte a las vesículas intracelulares basolaterales, y que 1187 no es suficiente para la transcitosis pero es suficiente para transportar la carga útil en las células epiteliales (por ejemplo, en los compartimentos supranucleares y basales).

EJEMPLO 5

Función de la Transcitosis *in vitro* de los vehículos derivados de Cholix

[000336] Este ejemplo muestra la función de la transcitosis apical a basal *in vitro* de varios vehículos derivados de Cholix que se acoplaron a la hormona de crecimiento humana a través de un espaciador usando la expresión recombinante como se describe en lo anterior en el Ejemplo 1.

[000337] Se evaluaron los siguientes vehículos por su capacidad para cruzar las monocapas de células epiteliales intestinales pequeñas humanas polarizadas (Tabla 10):

Tabla 10 – Constructos de suministro Probados

SEQ ID NO	**Anotación Cholix (con respecto a SEQ ID NO: 1)**
SEQ ID NO: 151	M+Cholix$^{1-134}$-$(G_4S)_3$-hGH
SEQ ID NO: 152	M+Cholix$^{1-151}$-$(G_4S)_3$-hGH
SEQ ID NO: 153	M+Cholix$^{1-187}$-$(G_4S)_3$-hGH
SEQ ID NO: 154	M+Chx$^{41-187}$-$(G_4S)_3$-hGH
SEQ ID NO: 155	M+Cholix$^{1-206}$-$(G_4S)_3$-hGH
SEQ ID NO: 156	M+Cholix$^{40-205}$-$(G_4S)_3$-hGH
SEQ ID NO: 157	M+Cholix$^{1-245}$-$(G_4S)_3$-hGH
SEQ ID NO: 158	M+Cholix$^{1-251}$-$(G_4S)_3$-hGH
SEQ ID NO: 159	M+Cholix$^{1-266}$-$(G_4S)_3$-hGH

[000338] Las figuras 11A-11B representan el transporte apical a basal de la hormona de crecimiento humana (hGH, SEQ ID NO: 190) sola y en comparación con el uso de hGH acoplado a los vehículos. Las longitudes del vehículo se indican por el truncamiento C-terminal con respecto a la referencia SEQ ID NO: 1 (es decir, “134” indica un vehículo que tiene los residuos 1-134 de SEQ ID NO: 1). Todos los vehículos incluyeron además una metionina N-terminal. La inmunotransferencia Western para hGH evaluó cualitativamente la capacidad de estas proteínas a someterse al transporte

apical a basal a través de las monocapas polarizadas de las células epiteliales intestinales pequeñas humanas primarias in vitro después de 2 horas. Las cantidades de materiales apicalmente aplicados fueron equivalentes sobre una base molar para el contenido de hGH, y se concentraron las recolecciones basales 10 veces antes del análisis.

[000339] La figura 11A muestra una comparación del transporte apical a basal de hGH (SEQ ID NO: 190) solos con respecto aquellos medidos para los constructos de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 151 – SEQ ID NO: 154 y SEQ ID NO: 159 con los truncamientos C-terminales en las posiciones 134, 151, 187, 41-187 y 266, respectivamente, de SEQ ID NO: 1. Los datos mostraron que los vehículos Cholix con los truncamientos C-terminales en las posiciones 134, 151, 187 de SEQ ID NO: 1, o un truncamiento N-terminal en 41 y un truncamiento C-terminal en 187 de SEQ ID NO: 1, mostraron un transporte apical a basal significativamente menor de la hGH conjugada en comparación con el constructo con un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 159) con un truncamiento C-terminal en 266 de SEQ ID NO: 1.

[000340] La figura 11B muestra que los constructos de suministro con SEQ ID NO: 155 y SEQ ID NO: 157 – SEQ ID NO: 159 incluyendo vehículos Cholix con los truncamientos C-terminales en las posiciones 206 (SEQ ID NO: 131), 245 (SEQ ID NO: 132), 251 (SEQ ID NO: 133), y 266 (SEQ ID NO: 134),

respectivamente, de SEQ ID NO: 1 mostraron un transporte apical a basal eficiente de la hGH co-unida (SEQ ID NO: 146). Mientras que los vehículos con los truncamientos C-terminales Cholix en las posiciones 245 y 251 mostraron un transporte apical a basal de hGH (SEQ ID NO: 146) comparable con aquel del vehículo con el truncamiento C-terminal en la posición 266, el vehículo con un truncamiento C-terminal Cholix en la posición 206 mostró una mejora significativa del transporte apical a basal de hGH en comparación con los vehículos con los truncamientos C-terminales en las posiciones 245, 251, y 266.

[000341] Estos resultados sugirieron que los residuos 1-266 de Cholix fueron suficientes para el transporte apical a basal, y que puede funcionar como un elemento de transcitosis para administrar varias cargas útiles heterólogas a través de las células epiteliales. Adicionalmente, se mostró que los elementos dentro de los primeros 206 residuos de aminoácidos del polipéptido de Cholix que consta de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 fueron suficientes para la función de transcitosis y de esta manera se pueden usar para lazar de manera eficiente (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 20%, 25%, o 50% de material aplicado a la superficie apical) las moléculas de carga útil heterólogas tal como cargas útiles terapéuticas y/o de diagnóstico a través de una capa de células epiteliales (por ejemplo, el epitelio intestinal),

permitiendo de esta manera la administración oral de la carga útil que de otra manera solo sería administrable a través de las vías de administración parenterales (por ejemplo, intravenosamente de subcutáneamente).

EJEMPLO 6

Función de Transcitosis *in vivo* de vehículos derivados de Cholix

[000342] Este ejemplo muestra la función de transcitosis apical a basal *in vivo* de varios vehículos derivados de Cholix que se acoplaron a la hormona de crecimiento humana a través de un espaciador usando la expresión recombinante como se describe en lo anterior en el Ejemplo 1.

[000343] Los vehículos Cholix seleccionados mostrados en la Tabla 10 del Ejemplo 5 se examinaron para su capacidad para la transcitosis *in vivo* después de la IL1 en el yeyuno de rata.

[000344] Los datos obtenidos en estos experimentos mostraron el grado del transporte apical a basal a través de las células epiteliales intestinales polarizadas en el yeyuno de rata de seis constructos de suministro, incluyendo cada uno un vehículo de Cholix diferente. La localización del vehículo de Cholix (fluorescencia roja) y hGH (fluorescencia verde) se mostró (Figuras 12A-12F) por microscopía de inmunofluorescencia usando los anticuerpos anti-hGH monoclonales y anti-Cholix policlonales, respectivamente. Las

flechas blancas indican la membrana apical, "1-p" se refiere, a *lamina propria*, "GC" se refiere a células caliciformes, y las flechas abiertas indican el constructo de suministro presente en la *lamina propria*.

[000345] La figura 12A muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 151) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 140) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146). La figura 12A muestra que el vehículo no permitió que el constructo de suministro entrara a células epiteliales, sugiriendo que un fragmento de secuencia funcional que tiene los residuos de aminoácidos 134151 de SEQ ID NO: 1 puede desempeñar una función en la endocitosis en células epiteliales polarizadas (en contraste, la figura 12B demuestra que el vehículo con SEQ ID NO: 139 permitió la entrada celular del constructo de suministro respectivo a través de endocitosis).

[000346] La figura 12A muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 152) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 139) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12B muestra que este constructo no entró a células epiteliales (como lo opuesto al constructo con SEQ ID NO: 151 descrito en la figura 12A) pero

permaneció principalmente en las acumulaciones vesiculares apicales y, algún grado, en las basales pero no entró a *lamina propria*. permitiendo de esta manera la administración de la carga útil a los compartimentos apicales y basales de una célula epitelial.

[000347] La figura 12C muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 153) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 136) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12C muestra que este constructo ingresó a células epiteliales, alcanzó los compartimientos apicales y basales, y también alcanzó una región supranuclear de la célula, que aún permaneció dentro de la célula epitelial, sugiriendo que el fragmento de secuencia que consta de los residuos de aminoácidos 152-187 de SEQ ID NO: 1 puede permitir el acceso y administración a las regiones supranucleares, así como permite la localización en los compartimientos basales.

[000348] La figura 12D muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 154) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 137) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12D muestra que este

constructo ingresó a células epiteliales pero permaneció en los compartimentos apicales y no pareció que alcanzara los compartimientos basales o supranucleares.

[000349] La figura 12E muestra el grado del transporte apical a basal 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 155) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 131) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura 12E mostró que este constructo completó el proceso de transcitosis como se indica por los constructos de suministro que alcanzan la *lamina propria* (ver flecha abierta), sugiriendo que el fragmento de secuencia que consta de los residuos de aminoácidos 188-206 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 puede permitir que el vehículo (y los constructos que comprenden este vehículo) se acople con los procesos de reciclaje basales que permiten la liberación del vehículo o constructo respectivo de la célula epitelial en un compartimento basolateral (por ejemplo, *lamina propria*).

[000350] La figura 12F muestra el transporte a través de monocapas epiteliales de yeyuno de rata *in vivo* 15 minutos después de la inyección intraluminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) como es mostrado por microscopía de inmunofluorescencia. La figura

12F muestra que este constructo completó el proceso de transcitosis como se indica por los constructos de suministro que alcanzan la *lamina propria* (ver flecha abierta).

[000351] De esta manera, estos resultados están en línea con los datos obtenidos de los experimentos de transcitosis in vitro descritos en Ejemplo 5 y mostraron que los vehículos con un truncamiento C-terminal en cualquiera de los residuos 206-266 de la secuencia de Cholix expuesta en SEQ ID NO: 1 puede transportar rápidamente (por ejemplo, al menos 10^{-6} cm/seg, 10^{-5} cm/seg) y de manera eficaz (por ejemplo, al menos 5%, 10%, 20%, 25%, o 50% del material aplicado a la superficie apical) moléculas de carga útil (por ejemplo, proteínas terapéuticas) a través de las células epiteliales (por ejemplo, a través de las células epiteliales intestinales polarizadas de un sujeto). Por otra parte, estos resultados mostraron que los vehículos con un truncamiento C-terminal en cualquiera de los residuos 151-187 de la secuencia de Cholix expuesta en SEQ ID NO: 1 y/o un truncamiento N-terminal en cualquiera de los residuos 1-40 de SEQ ID NO: 1 se puede usar para administrar varias cargas útiles heterólogas en las células epiteliales.

[000352] Basados en estos datos, los siguientes fragmentos de secuencia de Cholix funcionales se identificaron para vehículos derivados del polipéptido de Cholix de la SEQ ID NO: 1.

Tabla 11 - Fragmentos de secuencia de Cholix Ejemplares y su Función con el polipéptido de Cholix de SEQ ID NO: 1

SEQ ID NO	**Secuencia**	**Función**
SEQ ID NO: 165	$_{135}$DQQRNIIEVPKLYSIDL$_{151}$	Endocitosis
SEQ ID NO: 166	$_{1}$VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKL SIPSDVVLDEG$_{40}$	Translocación Apical-Basal
SEQ ID NO: 167	$_{151}$LDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIA ISWPSVSYKA$_{187}$	Localización Supranuclear
SEQ ID NO: 168	$_{188}$AQKEGSRHKRWAHWHTGLA$_{206}$	Liberación Basal

EJEMPLO 7

Vehículos derivados de Cholix se Co-localizan con Rab11a

[000353] Este ejemplo muestra que los vehículos derivados de Cholix se co-localizan con la proteína relacionada con Ras Rab11a (Rab11a o Rab11). La co-localización de un vehículo con Rab11a se puede presentar en el lado apical o el lado basal de una célula epitelial. Se mostró que la co-localización del vehículo con Rab11a en el sitio apical de una célula epitelial puede dirigir el vehículo a los endosomas de reciclaje apicales y/o en el lumen intestinal. La co-localización del vehículo con Rab11a en el lado basal de una célula epitelial indica que el vehículo puede usar mecanismos de reciclaje basales para su liberación de la membrana de células basales en los compartimentos

basolaterales (por ejemplo, *lamina propria*).

[000354] La co-localización de cuatro constructos de suministro con Rab11a se probó por la inyección intraluminal (IL1) de 50 L de $3,86x10^{-5}$ de soluciones M en PBS de los cuatro constructos de suministro diferentes. Estos constructos de suministro consistieron de las secuencias de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 152-154 y SEQ ID NO: 159.

[000355] La figura 13A, y la figura 13B, y la figura 13C muestra que los constructos de suministro con SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 152, y SEQ ID NO: 153, respectivamente, se co-localizaron con Rab11a en el lado apical de Las células epiteliales. Estos datos también muestran que los constructos con SEQ ID NO: 152 y SEQ ID NO: 154 no se localizaron significativamente en el lado basal, sino permanecieron principalmente en el lado apical. El constructo con SEQ ID NO: 153 se localizó tanto en el lado apical como basal, sin embargo, sólo se co-localizó con Rab11a en el lado apical y no en el lado basal (ver también, sub-imágenes 3a y 3b de la figura 13C que muestra localización incrementada en el sitio apical en comparación al sitio basal). Conjuntamente, estos resultados sugieren que los vehículos que no son capaces de la transcitosis apical a basal pueden ingresar los sistemas de reciclaje apicales dentro de las células epiteliales, como es mostrado por la co-localización con Rab11a en el sitio apical. Las mediciones se llevaron a cabo 15 minutos después

de la inyección intraluminal. La fluorescencia verde muestra la localización de hGH, la fluorescencia roja muestra la localización de Rab11a (o Rab11), y la fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI (descripción experimental idéntica para figura 13D).

[000356] La figura 13D muestra que el constructo de suministro con SEQ ID NO: 159 se co-localizaron con Rab11a en el lado basal pero no significativamente en el lado apical de las células epiteliales polarizadas. Esto sugirió que los vehículos capaces de transcitosis pueden utilizar el sistema de reciclaje basal para su liberación de la célula epitelial en la *lamina propria* (ver también, sub-imágenes 4a y 4b de figura 13D que muestra localización incrementada en el sitio apical en comparación al sitio basal).

[000357] Estos datos mostraron que un fragmento funcional de Cholix que permite la co-localización basal con Rab11a para acceder al sistema de reciclaje basal puede residir al menos dentro de los residuos de aminoácidos 187-266 de SEQ ID NO: 1.

[000358] Por otra parte, estos datos permiten que el diseño racional de vehículos que pueden transportar las cargas útiles a varias ubicaciones dentro de una célula epitelial o a través de esta célula epitelial. Para los ejemplos, los vehículos derivados de Cholix que comprenden o que constan de los residuos de aminoácidos 1-151, 1-187, 41-187, 41-187, 40-

205 o 41-205 de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 1 se puedan usar para la administración de carga útil intraepitelial, mientras que los vehículos derivados de Cholix que comprenden los residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 se pueden usar para transportar la carga útil a través de la barrera de células epiteliales y en la *lamina propria*.

EJEMPLO 8

Marcadores de Proteínas Específicas de Compartimento Celular para Evaluar el Tipo y Ubicación de los Socios de Interacción del vehículo de Cholix (TRIP)

[000359] Este ejemplo describe los marcadores de proteínas específicas de compartimento de células epiteliales que se usaron para determinar las proteínas que interactúan con los vehículos derivados de Cholix durante la endocitosis y/o transcitosis procesados.

[000360] La siguiente Tabla 12 muestra marcadores de proteínas específicas de compartimento de células ejemplares usadas en la presente. Por ejemplo, los constructos de suministro derivados de Cholix que comprenden una IL-10 como la carga útil heteróloga se siguieron durante los experimentos usando ya sea un anticuerpo monoclonal (mAb) contra IL-10 y/o un anticuerpo policlonal (pAb) desarrollado contra el vehículo de Cholix (por ejemplo, uno que comprende los residuos 1-266 o 1-386 de SEQ ID NO: 1).

Tabla 12 - Marcadores de Proteínas Específicas de Compartimento Celular

Diana	**pAb/mAb**	**Reactividad de especies**	**Hospedero**	**Dilución para IHC (P)**	**Notas**	**Almacena-miento**	**Cat. #**
Vehículo de Cholix	pAb		Conejo	1/500	Anti-suero entero	-20°C	-
IL-10	mAb; pAb	Humano	Ratón, Cabra	1/25		-20°C	-
EEA1	pAb	Ratón, rata, humano	Conejo	1/200	Endosoma temprano	-20°C	Ab2900
Rab7	mAb	Ratón, rata, humano	Conejo	1/100	Endosoma tardío	-20°C	Ab1267712
Rab11a	pAb	Ratón, rata, humano, Conejo, perro	Conejo	1/500	Endosoma de reciclaje	-20°C	Fisher 71-5300

LAMP1	pAb	Ratón, rata, humano	Conejo	1/500	Marcador de lisosomas	-20°C	Ab24170
GM130	pAb	Ratón, rata, humano	Conejo	1/500	Cis-Golgi	-20°C	-
Giantina	mAb	Rata, humano	Ratón	1/20	Golgi	-20°C	Ab37266
Proteína de Golgi 58K	mAb	Ratón, rata, humano	Ratón	1/100	Golgi	-20°C	Nb600-4512
TGN38	mAb	Ratón, rata, humano	Ratón	1/1000	Trans-Golgi	-20°C	Nb300-575
Calnexina	pAb	Ratón, rata, humano	Conejo	1/500	Retículo endoplásmico	-20°C	Ab22595
Clatrina	mAb	Ratón, rata, humano	Ratón	1/500	Endocitosis mediada por clatrina	-20°C	Ab2731

EJEMPLO 9

Estudios de Transcitosis *in vitro* revelan los Socios de

Interacción de los Receptores de Transporte (TRIP) para vehículos Derivados de Cholix

[000361] Este ejemplo demuestra la determinación de TRIP que vehículos derivados de Cholix interactúan durante la transcitosis a través de células epiteliales polarizadas. Este ejemplo muestra además los socios de interacción críticos que pueden desempeñar una función en al transcitosis de Cholix.

[000362] Las figuras 14A-14D muestran los efectos de inactivación de K8, HSPG (perlecan), y GRP75, respectivamente, en la función de transcitosis de un constructo de suministro con SEQ ID NO: 150 que incluye un vehículo derivado de Cholix con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 134 acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) a través de un espaciador cuya secuencia se expone en SEQ ID NO: 177. La línea de células estables de las células Caco-2 que carecen de la expresión de las proteínas candidato específicas K8 (Caco-2^{K8-}), HSPG (Caco-2^{HSPG-}), y GRP75 (Caco-2^{GRP75-}) también se usaron como monocapas *in vitro* para verificar su implicación en la transcitosis del vehículo (por ejemplo, vehículos Cholix) a través de un mecanismo de transportes endógenos activos y selectivos.

[000363] Las células Caco-2, parental o células estables parenterales K8, HSPG (perlecan), o de silenciamiento GRP74 (KO), se sembraron a $1,5x10^5$ células/ml en cada transwell. En

el día 18, 100 µl de PBS que contiene el constructo de suministro (SEQ ID NO: 150) en 20 µg/ml o hGH de control molar igual (SEQ ID NO: 190) se agregó en el lado apical y 500 µl de PBS en la cámara basal. La cantidad de proteínas en la solución basal después de 1 hora a 37°C se analizó por inmunotransferencia western. La inmunotransferencia se sondeó con un anti-hGH mAb.

[000364] La figura 14A muestra que la inactivación K8 no reduce significativamente la función de transcitosis del constructo de suministro (SEQ ID NO: 150).

[000365] La figura 14B muestra que la inactivación de HSPG (perlecan) no reduce no reduce significativamente la función de transcitosis del constructo de suministro (SEQ ID NO: 150).

[000366] La figura 14C muestra que la inactivación de GRP75 no reduce significativamente la función de transcitosis del constructo de suministro (SEQ ID NO: 150).

[000367] Después, se evaluó la dependencia de pH de la interacción entre una proteína Cholix y GRP75. **La figura** 15A muestra las interacciones de unión BiacoreMR (por ejemplo, resonancia de plasmones superficiales) usadas para examinar esta dependencia de pH de las interacciones del vehículo de Cholix-GRP75. Para ese fin, se acopló la biotina a la C-terminal de la proteína Cholix de longitud completa cuyas secuencias se expone en SEQ ID NO: 1 y se une

subsecuentemente a una superficie (por ejemplo, superficie de chip, placa de 96 concavidades de plástico, etc.) usando la bioconjugación de biotina-estreptavidina y se incubó con la proteína GRP75 purificada en soluciones amortiguadoras a pH 5,5, 6,5, y 7,5, respectivamente. La afinidad de unión más alta fue para esta interacción que se midió en pH 6,5. La figura 15A muestra que la afinidad de la proteína Cholix para GPR75 es de aproximadamente 2025 veces más alta en pH 6,5 en comparación con pH 7,5 o pH 5,5.

[000368] Además, la figura 15B muestra la dependencia de pH de la interacción de un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 189) con el receptor apical (por ejemplo, TMEM132), los receptores de evitaciones de lisosomas (por ejemplo, GRP75), el receptor del tráfico (por ejemplo, ERGIC-53), y el receptor basal (por ejemplo, perlecan). Esta dependencia de pH de interacción del receptor indica que un vehículo derivado de Cholix puede secuencialmente y dependiente de su ubicación interactuar con ciertos receptores. Por ejemplo, estos datos muestran que un vehículo derivado de Cholix tiene una afinidad significativamente más alta a la endocitosis y receptores de tráfico tempranos tal como receptor de entrada apical y receptor de evitación de lisosomas en pH 7,5. Una vez que el pH desciende a aproximadamente 5,5, la afinidad del vehículo de Cholix para estos receptores de tráfico temprano disminuye, mientras que su afinidad para su receptor

de tráfico apical-basal ERGIC-53 y la proteína de liberación basal perlecan se incrementa significativamente en ese pH, permitiendo que el vehículo de Cholix, "se dé" a los receptores de liberación de tráfico y basales durante el proceso de transcitosis vesicular.

[000369] La figura 16 muestra las interacciones de unión BiacoreMR significativas y secuenciales de la proteína Cholix de longitud completa cuya secuencia se expone en SEQ ID NO: 1 con el perlecan y GRP75, que muestran que el Cholix interactúa con ambas proteínas. Para el experimento de unión, 20 µl de proteína cholix-biotina a 50nM se capturó en la superficie del chip Biacore SA. 60 µl de la proteína perlecan humana (HSPG) a 200 Nm se inyectaron a la superficie del chip en la velocidad de 30 µl/min. 60 µl de la proteína GRP75 humana en 100 nM entonces se inyectó a través de la superficie del chip en la velocidad de 30 µl/min. La superficie del chip se regeneró al inyectar 50 µl de Glicina 10mM en pH 1,5 para remover todas las proteínas de unión.

[000370] La figura 17 muestra las interacciones de unión Biacore^{MR} significativas y secuenciales d la proteína Cholix de longitud completa con la secuencia como se expone en SEQ ID NO: 1 con GRP75, perlecan, y TMEM132A, mostrando que el Cholix interactúa con las tres proteínas. Para los experimentos de unión, 20 µl de proteína cholix-biotina en 50 nM se capturó en la superficie del chip Biacore SA. 30 µl de

la proteína GRP75 humana en 100 nM se inyectó a través de la superficie del chip en la velocidad de 30 µl/min. 60 µl de una proteína perlecan humana en 200 nM entonces se inyectó a través de la superficie del chip en la velocidad de 30 µl/min seguido por 30 µl de la proteína TMEM132A humana en 200 nM. La superficie del chip se regeneró al inyectar 50 µl de Glicina 10 en pH1.5 para remover todas las proteínas unidas.

[000371] Estos datos mostraron que GRP75 y perlecan puede desempeñar una función en la función de transcitosis de los vehículos derivados de Cholix, y las proteínas Cholix unen las proteínas GRP75, perlecan, TMEM132.

EJEMPLO 10

Vehículos derivados de Cholix que pasan a través de Células Epiteliales Polarizadas no pueden co-localizarse con $LAMP1^+$ o $Rab7^+$ y se pueden dirigir lejos de Lisosomas durante la Transcitosis Apical a Basal

[000372] Este ejemplo muestra que los vehículos derivados de un polipéptido de Cholix se dirigen lejos de los lisosomas durante la transcitosis y de esta manera no interactúan con la ruta de reciclaje lisosomas que permite que el vehículo pase de manera no alterada y completamente funcional a través de las células epiteliales polarizadas.

[000373] Las figuras 18A-18D muestran el destino de la hormona de crecimiento humana (hGH, SEQ ID NO: 190) que se suministró por inyección intraluminal (ILI, la superficie

luminal se indica como una flecha blanca en la Figura **18A-FIG.** 18F) en el yeyuno de rata in vivo se evaluó primero como un transporte expectante de control negativo a los lisosomas después de la captación celular.

[000374] La figura 18A muestra que la localización de hGH (SEQ ID NO: 190) 15 minutos pos-inyección (ILI) se limitó a una población pequeña de vesículas en la región apical de las células epiteliales como es mostrado por la detección de inmunofluorescencia verde.

[000375] La figura 18B, figura 18C, y la figura 18D muestran que 15 min pos-ILI, hGH (SEQ ID NO: 190) se co-localizó con la proteína de membrana lisosomal-asociada 1 (LAMP1, la fluorescencia roja) (Figura 18B) y proteína relacionada a Ras (Rab7, fluorescencia púrpura) (Figura 18C) con aproximadamente la misma frecuencia y características de los lisosomas $LAMP1^+$, $Rab7^+$ residentes (Figura 18D), indicando que la hGH se dirigió a la ruta destructiva lisosomal (por ejemplo, reciclaje) poco después de la captación en las células epiteliales.

[000376] La figura 18E y la figura 18F muestran que un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que incluye un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) mediante un espaciador (SEQ ID NO: 175), se dirigió lejos de la ruta lisosomal y de esta manera no mostró co-localización con ya sea LAMP1 (Figura 18E) o Rab7 (Figura

18F), permitiendo de esta manera la transcitosis de la carga útil funcional a través de las células epiteliales polarizadas en la lamina propria.

[000377] La figura 19A muestra que la distribución de la proteína de recubrimiento I (COPI, la fluorescencia roja) se restringió a la membrana apical luminal y el compartimento vesicular apical a células epiteliales antes de la inyección luminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que incluye un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146) mediante un espaciador (SEQ ID NO: 175). En comparación, la Figura 19B muestra que la inyección intraluminal apical (ILI, superficie luminal se indica como una flecha blanca en la Figura 19A-Figura 19D) del constructo de suministro (SEQ ID NO: 159), indujo la redistribución COPI a una ubicación supra-nuclear, indicando la co-localización de las vesículas que contienen tanto el constructo de suministro con SEQ ID NO: 159 como COPI. La fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI. Las mediciones en las Figuras 19A-19D se llevaron a cabo 15 minutos post-ILI.

[000378] La figura 19C muestra que LMAN1 (la fluorescencia verde) se co-localizó con COPI (la fluorescencia roja) en una región apical (resaltada por la flecha blanca) de las células epiteliales polarizadas antes de la inyección de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159).

[000379] La figura 19D muestra que, después de la ILI apical (resaltada por la flecha blanca) de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159), LMAN1 interactuó y se distribuyó con el constructo de suministro a la región basal de la célula epitelial, que esta adyacente a la *lamina propria* (indicada como "l-p"). De esta manera, la re-distribución LMAN1 parece que se usa por los vehículos Cholix para moverse del lado apical de la célula epitelial a un compartimiento basal.

[000380] Un experimento de seguimiento mostró que los vehículos derivados de Cholix pueden usar proteínas ERGIC (por ejemplo, ERGIC-53) para pasar de los compartimientos apicales a basales después de la endocitosis.

[000381] Las figuras 19E-19H muestran el tráfico de un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) de los compartimentos apicales (indicados por la flecha blanca #1) a basales (indicados por la flecha blanca #2) en las células epiteliales 5 (Figura 19F), 10 (figura 19G), y 15 min (figura 19H) después de la inyección luminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que comprende un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a una hGH (SEQ ID NO: 146) en el yeyuno de rata. La localización del vehículo de Cholix se muestra por fluorescencia verde, la localización del receptor ERGIC se muestra por fluorescencia roja, y la localización del complejo de proteína del tráfico

ER-Golgi se muestra por fluorescencia púrpura; de esta manera la interacción del vehículo de Cholix y el receptor ERGIC se muestra por fluorescencia amarilla, interacción del vehículo de Cholix y el complejo de proteína del tráfico de ER-Golgi se muestra por fluorescencia rosa, e la interacción y/o co-localización del vehículo de Cholix, el receptor ERGIC, y el complejo de proteína del tráfico ER-Golgi se muestra por puntos blancos (superposición de fluorescencia verde, roja, y púrpura). La inmunotransferencia DAPI se indica por fluorescencia azul.

[000382] La figura 19E muestra células epiteliales intestinales polarizadas no tratadas.

[000383] La figura 19F muestra localización e interacción del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) con el complejo de tráfico ER-Golgi 5 minutos después de la inyección luminal en el compartimiento apical como se indica por la señal de fluorescencia rosa en los compartimientos apicales.

[000384] La figura 19G muestra el tráfico del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) en asociación con ERGIG-53 a la membrana basal 10 minutos después de la inyección luminal seguido por la liberación basal del vehículo (y constructo) en la *lamina propria* (flecha dorada). Estos datos mostraron que los vehículos derivados de Cholix usan interacciones específicas con las proteínas ERGIC para “secuestrar” el tráfico vesicular de los compartimientos apicales a basales

de una célula epitelial polarizada.

[000385] La figura 19H muestra las cantidades incrementadas del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) presente en la *lamina propria* 15 minutos después de la inyección luminal.

[000386] Las figuras 19I-19K muestran que un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) usó los mecanismos de secreción de proteínas basales para traficar a través de una célula epitelial polarizada en la *lamina propria*. Las imágenes de microscopia de fluorescencia se adquirieron 15 minutos después de la inyección luminal de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que comprende un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a una hGH (SEQ ID NO: 146) en el yeyuno de rata, y mostró que las vesículas basales pueden comprender el vehículo de Cholix y el receptor ERGIC-53, el vehículo de Cholix y la proteína de secreción basal, o las tres del vehículo de Cholix, el receptor ERGIC-53, y la proteína de secreción basal. La localización del vehículo de Cholix se muestra por fluorescencia verde (usando un anticuerpo anti-vehículo de Cholix), la localización del receptor ERGIC-53 se muestra por fluorescencia roja, y la localización de la proteína de secreción basal se muestra por fluorescencia púrpura; de esta manera la interacción del vehículo de Cholix y el receptor ERGIC-53 se muestra por fluorescencia amarilla, la interacción del vehículo de Cholix y la proteína de secreción basal se muestra por fluorescencia

rosa, y la interacción y/o co-localización del vehículo de Cholix, el receptor ERGIC-53, y la proteína de secreción basal se muestra por puntos blancos (súper posición de fluorescencia verde, roja y púrpura). La inmunotransferencia DAPI se indica por fluorescencia azul.

[000387] La figura 19I muestra que las vesículas de compartimiento basal contuvieron el vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) y el receptor ERGIC-53 como se indica por la fluorescencia amarilla.

[000388] La figura 19J muestra que las vesículas de compartimiento basal contuvieron el vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) y la proteína de secreción basal como se indica por la fluorescencia rosa.

[000389] La figura 19K muestra que las vesículas de compartimiento basal contuvieron el vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134), el receptor ERGIC-53, y loa proteína de secreción basal como se indica por los puntos blancos (por ejemplo, superposición de fluorescencia verde, roja y púrpura).

[000390] La figura 20A muestra la distribución de otro elemento de compartimiento intermedio del retículo-Golgi endoplásmico (ERGIC), SEC22b, en ausencia de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159). En los tejidos no tratados (es decir, sin inyección de un constructo de suministro), SEC22b y LMAN1 se co-localizan extensivamente en el compartimiento

apical mientras el LMAN1 se observó solo separadamente cercano a la membrana plasmática apical. En las figuras 20A-20D, la fluorescencia roja muestra la localización de LMAN1, la fluorescencia púrpura muestra la localización de SEC22b, la fluorescencia verde muestra localización de hGH, la flecha blanca indica la superficie apical, y "G" indica células Caliciformes.

[000391] La figura 20B muestra que 5 minutos después de ILI de un constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) que incluye un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 134) acoplado a hGH (SEQ ID NO: 146), LMAN1, SEC22b, y hGH se co-localizaron en el compartimiento apical pero no significativamente en los compartimientos basales de las células epiteliales.

[000392] La figura 20C muestra que 10 minutos post ILI, el constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) y LMAN1 se observaron que se co-localizan en el compartimiento basal de las células epiteliales sin SEC22b, confirmando que LMAN1 interactúa y se movió con el constructo de suministro dentro de la vesícula del compartimiento vesicular apical basal de las células epiteliales.

[000393] La figura 20D muestra que el grado del constructo de suministro (SEQ ID NO: 159) y LMAN1 que se co-localizan en el compartimiento basal 15 minutos post ILI habían incrementado, con una cantidad significativa de hGH que alcanza la *lamina propria* a través del tiempo.

[000394] La figura 20E, la figura 20H muestran las mismas secciones del tejido como se describe en lo anterior y mostradas en Figura 20A-Figura 20D pero que muestran solo las señales LMAN1 y SEC22b (sin señal hGH). Esto mostró la profunda redistribución del LMAN1 al compartimiento basal sin una redistribución de SEC22b en respuesta a la aplicación apical de una administración (SEQ ID NO: 159). Estos datos mostraron además que los constructos de suministro que comprenden un vehículo derivado de Cholix puede usar las rutas de tráfico Cholix endógenas que permiten el transporte rápido y eficiente de la carga útil a través del epitelio intestinal al acoplar esta carga útil al vehículo.

[000395] Conjuntamente, estos datos mostraron que los vehículos derivados de Cholix usaron mecanismos de tráfico bacterianos endógenos para lograr la transcitosis apical basal, permitiendo que estos vehículos y los constructos de suministro que comprenden estos vehículos pasen del lumen intestinal a la *lamina propria* sin deteriorar la función de la barrera de un epitelio intestinal y sin ser modificados enzimática o químicamente durante este transporte. Estos mecanismos de transporte epiteliales pueden permitir la administración oral de un constructo de suministro terapéutico que comprende un vehículo derivado de Cholix acoplado a una carga útil terapéutica y transporte de la carga útil terapéutica a través de las membranas epiteliales

intactas y polarizadas.

EJEMPLO 11

Modelo de Superficie de un vehículo derivado de Cholix

[000396] Este ejemplo muestra los elementos de secuencia estructurales de un polipéptido de Cholix con SEQ ID NO: 178.

[000397] Las figuras 21A-21E muestran un modelo de superficie ejemplar de un vehículo derivado de Cholix que consta de SEQ ID NO: 178 (incluye los residuos de aminoácidos 1-265 de SEQ ID NO: 1 y una metionina N-terminal) que se usó para resaltar las regiones seleccionadas de interés que pueden desempeñar una función en ciertas funcionalidades relacionadas con la transcitosis apical basal, así como su posición relativa y proximidad en la superficie de la proteína. Las regiones de aminoácidos situadas dentro de los residuos V^{1} y E^{39} son adyacentes a los aminoácidos expuestos en la superficie D^{150}-K^{186} y K^{186}-L^{205}. Específicamente, L^{17}-I^{25} (región X1, SEQ ID NO: 160) y T^{170}-I^{176} (región X2, SEQ ID NO: 161) se coordinan para formar una bolsa rodeada por varias cargas negativas. Similarmente, K^{186}-H^{202} (región X3, SEQ ID NO: 162) se coordina con I^{31}-E^{39} (región X4, SEQ ID NO: 163) para formar una estructura de puente continua. Además, el modelo de superficie muestra residuos D^{135}-N^{139} (región X5, SEQ ID NO: 164), y los residuos de asparagina (por ejemplo, sitios de glicosilación potenciales) resaltados en púrpura.

[000398] La figura 21A muestra la secuencia de aminoácidos

de un polipéptido de Cholix con SEQ ID NO: 178. La figura 21B muestra la localización de las regiones X1, X3 y X4. La figura 21C muestra la localización de las regiones X1 y X2, así como X3 y X4. La figura 21D muestra la localización de las regiones X1, X2, X4 y X5.

[000399] Estos datos estructurales muestran que los fragmentos de secuencia funcionales dentro de la secuencia de Cholix de SEQ ID NO: 1 pueden tener una proximidad cercana entre sí tal como las regiones X3 y X4 y las regiones X1 y X2.

EJEMPLO 12

Constructos de suministro derivados de Cholix interactúan y/o se co-localizan con varias Proteínas Marcadoras durante la Transcitosis usando Distintos Compartimientos

[000400] Este ejemplo muestra que los vehículos derivados de Cholix pueden usar distintos compartimientos para el tráfico dentro y a través (por ejemplo, a través de transcitosis) de las células epiteliales usando varias proteínas marcadoras (ver por ejemplo, Ejemplo 8). Estos datos indican que los constructos del vehículo derivado de Cholix se pueden usar o "secuestrar" rutas de tráfico Cholix específicas endógenas (Figura 24). El estudio descrito en este ejemplo se condujo usando el constructo de suministro derivado de Cholix que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 que incluye un vehículo (SEQ ID NO: 135) acoplado a IL-10 (SEQ ID NO: 145) a

través del espaciador con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 176.

[000401] Las figuras 22A-22L ilustran un análisis de ruta de tráfico para un constructo de suministro derivado (SEQ ID NO: 149). En las figuras 22A-22L la flecha blanca #1 resalta la superficie apical, la flecha blanca #2 resalta la superficie basal, y la flecha blanca #3 resalta la *lamina propria*.

[000402] La figura 22A muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado en gran medida con el antígeno EEA1 en las ubicaciones celulares consistente con el tráfico en ambos compartimientos apicales y basales de las células epiteliales, sugiriendo que la presencia del constructo de suministro derivado de Cholix en los compartimientos de endosomas tempranos. La fluorescencia roja muestra la localización del antígeno EEA1, y la fluorescencia verde muestra la localización de IL-10.

[000403] La figura 22B muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado en gran medida con Rab7 (izquierda superior) predominantemente en el compartimiento apical de las células epiteliales, pero con solo co-localización limitada en las células dentro de la *lamina propria*, sugiriendo la presencia del constructo de suministro derivado de Cholix en los compartimientos de endosoma tardíos (izquierda de fondo muestra la imagen de luz blanca, y la derecha de fondo muestra la inmunotransferencia

fusionada con la inmunotransferencia DAPI que se muestra en azul, la fluorescencia roja que muestra la localización del antígeno EEA1, y la fluorescencia verde que muestra la localización de IL-10).

[000404] La figura 22C muestra que LAMP1 se identificó en las vesículas específicas, grandes consistentes con los lisosomas maduras que estuvieron desprovistos del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) (flechas blancas, la fluorescencia roja que muestra la localización del antígeno EEA1, y la fluorescencia verde que muestra la localización de IL-10). El constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado, sin embargo, con el antígeno LAMP1 en las ubicaciones celulares diferentes a las estructuras similar a lisosoma, consistentes con el tráfico de vesículas en ambos de los compartimientos apicales y basales de las células epiteliales, sugiriendo la presencia del constructo de suministro derivado de Cholix en los compartimientos endosomales tardíos.

[000405] La figura 22D muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado también en gran medida con las vesículas recubiertas con clatrina, particularmente en las áreas adyacentes al núcleo, y con Rab11a predominantemente en el compartimiento basal de células epiteliales así como en las células seleccionadas dentro de la lamina propria. La inmunotransferencia DAPI s

muestra en azul, la fluorescencia roja muestra la localización del antígeno IL-10, y la fluorescencia verde muestra la localización de clatrina.

[000406] La figura 22E muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado con el retículo endoplásmico como es mostrado por la calnexina (la fluorescencia roja que muestra la localización de la calnexina, y la fluorescencia verde que muestra la localización de IL-10) en un patrón adyacente al núcleo en las células epiteliales y en la fracción grande de las células dentro de la *lamina propria*. Específicamente, el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) se co-localiza en gran medida con el compartimento intermedio de Golgi de retículo endoplasmático (ERGIC) y el antígeno LMAN1 que pareció que se re-distribuye en respuesta a la endocitosis y transcitosis del vehículo, como se muestra durante 5 (figura 22F), 10 (figura 22G), y 15 minutos después de la inyección (figura 22H).

[000407] La figura 22F muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado en gran medida con el compartimiento de intermedio de Golgi de retículo endoplásmico 53 (ERGIC-53) y el antígeno LMAN1 (la fluorescencia roja que muestra la localización de ERGIC-53 y LMAN1, y la fluorescencia verde que muestra la localización de IL-10, la fluorescencia azul que muestra la

inmunotransferencia DAPI) pareció que se redistribuye en respuesta a la endocitosis y transcitosis del vehículo, como se muestra durante 5 minuto después de la inyección.

[000408] La figura 22G muestra el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado con el antígeno LMAN1 10 minutos después de la inyección. Los datos muestran la localización significativa del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) en la *lamina propria*.

[000409] La figura 22H muestra el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) co-localizado con el antígeno LMAN1 15 minutos después de la inyección. Los datos mostraron la localización significativa del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) en la *lamina propria*.

[000410] La figura 22I muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) no se co-localizó con los niveles bajos de giantina presentes en las células epiteliales (la fluorescencia roja muestra la localización de IL-10, y la fluorescencia verde muestra la localización de giantina, la fluorescencia azul muestra la inmunotransferencia DAPI). Alguna giantina se co-localizó con el constructo en un subconjunto de células presentes en la *lamina propria*, sugiriendo que el vehículo derivado de Cholix no se localizó con el compartimiento de Golgi.

[000411] La figura 22J muestra que el antígeno 58K se localizó en las células epiteliales en un sitio apical al

núcleo y el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) se mostró alguna co-localización (la fluorescencia roja muestra la localización de IL-10, y la fluorescencia verde muestra la localización del antígeno de Golgi 58K, la fluorescencia azul muestra la inmunotransferencia DAPI) con su proteína en una manera que sugiere un leve movimiento a través de este compartimiento. No se observó el antígeno 58K en las células dentro de la *lamina propria*.

[000412] La figura 22I muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149, izquierda superior, la localización IL-10) mostró algún nivel de co-localización con el antígeno TGN38 (derecha superior), que mostró una distribución celular que se restringió al lado apical de los núcleos en las células epiteliales y adyacente al núcleo en algunas células dentro de la lamina propria. La imagen izquierda de fondo muestra una imagen de luz blanca y la derecha de fondo muestra una fusión (superposición) con IL-10 (rojo), TGN38 (verde), y la señal DAPI (fluorescencia azul).

[000413] La figura 22L muestra que el constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) (la localización IL-10 mostrada por la fluorescencia verde, derecha superior) se co-localiza en gran medida con Rab11a (izquierda superior, la localización mostrada por la fluorescencia roja) predominantemente en el compartimiento basal de las células epiteliales y en las células seleccionadas dentro de la

lamina propria. La imagen a la izquierda de fondo muestra una imagen de luz blanca y la derecha de fondo muestra una fusión (superposición) con IL-10 (verde), Rab11a (rojo), y señal DAPI (fluorescencia azul).

[000414] Las figuras 23A-23C muestran imágenes de microscopia que muestran la transcitosis de una IL-10 a través de células epiteliales intestinales polarizadas en ratas Wistar en varios puntos de tiempo después de la aplicación luminal del constructo de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 al yeyuno de rata. El constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) incluyó un vehículo con SEQ ID NO: 135 acoplado a una carga útil de IL-10 que tiene los aminoácidos expuestos en SEQ ID NO: 145 a través de un espaciador que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 176. La fluorescencia verde indica la presencia de IL-10 (a través de la inmunotransferencia con un anticuerpo anti-IL-10). La fluorescencia azul indica la inmunotransferencia DAPI, que etiqueta el ADN, y la fluorescencia roja indica la presencia de CK-8 (intercelucina-8) con lo cual un vehículo derivado de Cholix se puede co-localizar (por ejemplo, en una región supranuclear de una célula epitelial) durante la transcitosis. Las flechas blancas #1 resaltan la membrana apical de las células epiteliales, y las flechas blancas #2 resaltan la membrana basal de las células epiteliales.

[000415] La figura 23A muestra el grado de transcitosis de IL-10 un minuto después de la aplicación luminal del constructo de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 al yeyuno de rata. Los datos mostraron que el transporte de una carga útil de IL-10 del sitio apical al basal y en la *lamina propria* se presentó tan temprano como 1 minuto después de la aplicación del constructo de suministro. La flecha blanca #3 indica la presencia de IL-10 en la *lamina propria*.

[000416] La figura 23B muestra el grado de transcitosis de IL-10 cinco minutos después de la aplicación luminal del constructo de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 al yeyuno de rata. Los datos mostraron una cantidad incrementada de la carga útil de IL-10 transportada que estuvo presente en la *lamina propria* (ver por ejemplo, flechas blancas #3) 5 minutos después de la aplicación luminal del constructo de suministro.

[000417] La figura 23C muestra el grado de transcitosis de IL-10 diez minutos después de la aplicación luminal del constructo de suministro con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 149 al yeyuno de rata. Los datos mostraron una cantidad aún más alta de la carga útil de IL-10 transportada que estuvo presente en la *lamina propria* (ver por ejemplo, flechas blancas #3) 10 minutos después de la aplicación luminal del constructo de suministro.

[000418] Los experimentos de tráfico adicionales usando la microscopía de fluorescencia se han conducido para arrojar luz sobre el mecanismo de transcitosis del vehículo de Cholix con SEQ ID NO: 135 que se incluye en el constructo de suministro con SEQ ID NO: 149.

[000419] Las figuras 23D-23F muestran la endocitosis apical y el tráfico temprano del vehículo de Cholix con SEQ ID NO: 135 en las célula epiteliales 1 min después de la inyección luminal del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) que comprende el vehículo de Cholix con SEQ ID NO: 135 acoplado a una IL-10 (SEQ ID NO: 145) en el yeyuno de rata. Los datos mostraron que los vehículos derivados de Cholix evitan la ruta de destrucción lisosomal al interactuar con los receptores de evitación de lisosoma. La localización del vehículo de Cholix se muestra por fluorescencia verde, la localización del receptor de entrada apical (por ejemplo, TMEM132) se muestra por fluorescencia roja; y la localización de los receptores de evitación de lisosoma se muestra por fluorescencia púrpura; de esta manera la interacción del vehículo de Cholix y el receptor de entrada apical se muestra por fluorescencia amarilla, la interacción del vehículo de Cholix y el receptor de evitación de lisosoma se muestra por fluorescencia rosa, y la interacción y/o co-localización del vehículo de Cholix, el receptor de entrada apical, y el receptor de evitación de lisosoma se muestra por puntos

blancos (superposición de florescencia verde, roja y púrpura). La inmunotransferencia DAPI se indica por fluorescencia azul.

[000420] La figura 23D muestra la localización del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) en la membrana apical (indicada por la flecha blanca #1) de una célula epitelial polarizada. La membrana basal se indica por la flecha blanca #2 y la *lamina propria* se indica por la flecha blanca #3.

[000421] La figura 23E muestra la interacción del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) con el receptor de entrada apical (por ejemplo, TMEM132) como se indica por la fluorescencia amarilla en y alrededor de la membrana apical.

[000422] La figura 23F muestra que el vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135), el receptor de entrada apical, y el receptor de evitación de lisosoma están en proximidad cercana en la membrana apical como se muestra por los puntos blancos (por ejemplo, superposición de fluorescencia verde, roja y púrpura) indicada por la flecha blanca. Se asume que el receptor de evitación de lisosoma puede aproximarse al complejo de receptor de entrada apical-vehículo de Cholix, seguido por la disociación del vehículo de Cholix con el receptor de entrada apical y la asociación del vehículo de Cholix con el receptor de evitación de lisosomas debido a los cambios en el entorno de pH y la dependencia de pH de esta interacción de vehículo de Cholix-receptor como se muestra,

por ejemplo, en la Figura 15B.

[000423] Las figuras 23G-23H muestran el tráfico de un vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) de los compartimientos apicales a supranucleares en la células epiteliales 5 y 15 min después de la inyección luminal del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149) que comprende un vehículo derivado de Cholix (SEQ ID NO: 135) acoplado a una IL-10 (SEQ ID NO: 145) en el yeyuno de rata. La localización del vehículo de Cholix se muestra por fluorescencia verde, la localización del receptor ERGIC se muestra por fluorescencia roja, la localización del receptor de entrada apical (por ejemplo, TMEM132) se muestra por fluorescencia naranja; y la localización de los receptores de evitación de lisosoma se muestra por fluorescencia púrpura; de esta manera la interacción del vehículo de Cholix y el receptor ERGIC se muestra por fluorescencia amarilla, la interacción del vehículo de Cholix y el receptor de evitación de lisosomas se muestra por fluorescencia rosa, y la interacción y/o co-localización del vehículo de Cholix, el receptor de entrada apical, y el receptor de evitación de lisosoma se muestra por puntos blancos (superposición de fluorescencia verde, roja y púrpura). La inmunotransferencia DAPI se indica por fluorescencia azul.

[000424] La figura 23G muestra la localización del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) en una célula epitelial intestinal

polarizada 5 minutos después de la inyección luminal del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149). Los datos mostraron que, después de la endocitosis mediada por receptor apical, el vehículo de Cholix formó complejos con un receptor de evitación de lisosoma y el receptor de entrada apical cercano a la membrana apical (indicada por los puntos blancos (superposición de fluorescencia verde, rojo y púrpura) y resaltada por la flecha blanca) y también comenzó la interacción con el receptor ERGIC como es mostrado por la fluorescencia amarilla (y la flecha amarilla) ligeramente más cercana a las regiones supranucleares dentro de la célula.

[000425] La figura 23H muestra la localización del vehículo de Cholix (SEQ ID NO: 135) en una célula epitelial intestinal polarizada 15 minutos después de la inyección luminal del constructo de suministro (SEQ ID NO: 149). Los datos mostraron que el vehículo se movió de los compartimientos apicales a supranucleares mientras que se asoció con ERGIC (ver flecha amarilla), en donde la intensidad de fluorescencia amarilla se incrementa en comparación con 5 minutos pos-inyección, indicando el movimiento del vehículo de Cholix incrementado de las regiones apicales a supranuclear a través del tiempo. Los datos mostraron además la localización del vehículo de Cholix en la membrana basal y en la *lamina propria* (flechas doradas).

[000426] Conjuntamente, estos datos mostraron que los

vehículos derivados de Cholix pueden usar las rutas de tráfico Cholix endógenos para someterse a transcitosis a través de las células epiteliales polarizadas y de esta manera se pueden usar para transportar rápida y eficientemente la carga útil (por ejemplo, proteínas terapéuticas tal como interleucinas) a través de las barreras de células epiteliales sin deteriorar la actividad biológica de esta carga útil.

EJEMPLO 13

Transporte de Agentes Anti-TNFα a través de Capas de Células Epiteliales

[000427] Este ejemplo muestra el vehículo derivado de polipéptido de Cholix que puede transportar los agentes anti-TNFα a través de las capas de células epiteliales intactas.

[000428] Los constructos de suministro se prueban para el transporte epitelial intestinal como sigue: ratas de tipo silvestre (Sprague DawleyMR, ~200 – 250 gramos, ~ 6 semanas de edad, adquiridas de Charles River) estuvieron en ayunas durante la noche para limpiar los intestinos; preparar los tubos de microfuga que contienen 4% de formaldehído, y tubos para conservación de tejido, tubos de microfuga para colección de sangre, tubos de microfuga para colección de suero, PBS, y artículo de prueba; los animales se preparan para experimento (anestesiar los animales con Isofluorano, y afeitar el abdomen); preparar las inyecciones para cada

animal (cada animal recibe 4 inyecciones (2 x yeyuno y 2 x colon); se abrió la cavidad abdominal, se situaron y se marcaron los sitios de inyección con colores distintivos; se inyectan lentamente el artículo de prueba en el lumen (la inyección se presenta a 10 minutos en colon y 40 minutos en el yeyuno) y los animales reciben 35 µg de la proteína por inyección en concentración de µg/µL; los animales se sacrificaron a 50 minutos; la sangre terminal se recolecta a través de la punción cardíaca; se remueve el yeyuno y el colon y se colocan en la superficie de trabajo recubierta de plástico; se lavan los contenidos del yeyuno y colón usando PBS y se eliminan; se escinde 1 cm de longitud de intestino del sitio de la inyección; se corta el tejido escindido a la mitad, y se coloca una sección en 4% de formaldehído. El tejido restante entonces se corta a lo largo y se coloca inmediatamente en el tubo de centrífuga y se congela. Este proceso se puede repetir para todos los sitios de inyección. Se remueve el hígado (~1cm^3) y se divide en 2 piezas. Se coloca 1 sección del hígado en formaldehído y la segunda para almacenamiento congelado inmediato. Las muestras intestinales, de hígado y suero de sangre se recolectan a 40 min de terminación. Se centrifugan las muestras de sangre y se transfiere el suero al contenedor para almacenamiento. Las muestras se transportan sobre hielo seco y se almacenan a -80°C. La estrategia de dosificación fue como sigue: Chx^{386}

anti-TNFα 100 µL, 490 pmol / 98 µg (4,9 uM); Chx^{415} anti-TNFα 100 µL, 490 pmol / 99,5 µg (4,9 uM); anti-TNFα 100 µL, 490 pmol / 76 µg (4,9 uM).

[000429] El análisis bioanalítico del transporte epitelial intestinal de los constructos Cholix-anti-TNF-α se llevan a cabo usando un equipo IgG1 ELISA de ratón (abcamMR, Cat# ab133045) como sigue: las muestras de tejido se obtienen de Brains On-line; 300 µL de amortiguador de ensayo 1X se agregan a cada tubo que contiene la muestra de tejido; el tejido se remueve del amortiguador de ensayo y se coloca en una placa de tapa de cultivo de células limpias, estéril; las muestras intestinales se raspan suavemente con un raspador de células siendo cuidadoso para evitar la recolección del mesenterio; las muestras de hígado se tratan en una manera similar con maceración y homogenización adicional; el homogenado celular resultante se transfiere de nuevo al tubo original; las muestras de tejido restantes y el área de trabajo se lavan con 100 µL de amortiguador (2x); la solución homogenada celular se centrifuga en una fuerza máxima durante 5 minutos; el sobrenadante se aplica a la placa ELISA de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sobrenadante restante se almacena -20°C para uso posterior.

[000430] La figura 25 muestra que tanto un vehículo derivado de $Cholix^{386}$ (por ejemplo, SEQ ID NO: 135 o 180) y un vehículo derivado de $Cholix^{415}$ (por ejemplo, que comprende los residuos

1415 def SEQ ID NO: 1) transportan un agente anti-TNFα (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNFα o fragmento funcional del mismo) a través de las células epiteliales intestinales a 10 minutos y a 40 minutos. Por otra parte, un constructo Cholix^{386}-anti-TNFα se transporta aproximadamente 12x la velocidad del anti-TNF-α solo y un Cholix^{415}-anti-TNFα se transporta a ~7x de la velocidad del anti-TNF-α solo.

[000431] Estos datos muestran que los vehículos derivados de Cholix son capaces de transportar una variedad de moléculas de carga útil tal como el agente anti-TNFα a través de las capas de células epiteliales intactas y polarizadas.

EJEMPLO 14

Preparación de Constructos de suministro que comprenden Exenatida

[000432] Exenatida (SEQ ID NO: 195) es un péptido que tiene actividad biológica tipo GLP-1 que se estabiliza por una amina C-terminal y una H N-terminal. En este ejemplo, dos constructos aislados que no se presentan naturalmente que comprenden: 1) un vehículo que tiene SEQ ID NO: 194 se procesó a un vehículo que tiene SEQ ID NO: 192 y se reticuló a SEQ ID NO: 195 y 2) un vehículo que tiene SEQ ID NO: 191 se procesó al vehículo que tiene SEQ ID NO: 193 y se reticuló a SEQ ID NO: 195 se prepararon y probaron para el transporte epitelial intestinal in vivo. Los vehículos que tienen SEQ ID NO: 191 y SEQ ID NO: 192 se prepararon como se describe en la

presente y Exenatida (SEQ ID NO: 195) (Cat# HOR-246) se adquirió de ProSpec-Tany Technogene Ltd. PO Box 6591, East Brunswick, NJ 08816. Un Equipo de Reticulación de Proteína-Proteína Controlada Pierce^{MR} (Cat# 23456) que comprende el Agente de Reticulación Sulfo-SMCC se adquirió de ThermoFisher.

Activación y reticulación de la carga útil y el vehículo:

[000433] El Exenatida (10 mg) se disolvió en 5 mL de H_2O para formar una solución de 2 mg/mL. El Sulfo-SMCC (2 mg) se disolvió en 2 mL de PBS. Inmediatamente después, 0,088 mL (~5 veces el exceso molar) de la solución de Sulfo-SMCC se agregó a 1,0 mL de solución de Exenatida y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El Sulfo-SMCC no reaccionado se removió al aplicar 1,0 mL de la mezcla de reacción de maleimida-Exenatida a una columna de desalación equilibrada con PBS, eluyéndose con PBS, y recolectando fracciones de 0,5 mL. La absorbancia a 280nm de cada fracción se midió para ubicar el pico de proteína. Se mezclaron fracciones pico que contienen la mayoría de la proteína. La concentración de Exenatida activado acumulado se determinó al comparar su absorbancia 280 nm con la absorbancia de la solución de proteína original.

[000434] Los vehículos que tienen SEQ ID NO: 193 y SEQ ID NO: 194 tienen una extensión C-terminal que comprende un sitio de escisión TEV flanqueado por dos residuos de cisteína

que forman una unión de disulfuro y una etiqueta His_6 C-terminal. Los vehículos que tienen SEQ ID NO: 193 y SEQ ID NO: 194 se purificaron en una columna HisTrap utilizando los métodos estándares. 2 mg de proteína (200 µL de 10 mg/ml) en PBS en pH 7,4 se activó por tratamiento con 2 µl de ditiotreitol 0,1M y 5 µl de proteasa TEV durante dos horas a 30°C. La proteína escindida y reducida se aplicó a una columna HisTrap de 1-ml equilibrada con PBS. El fragmento C-terminal unido a la columna y el producto de SEQ ID NO: 191 o la SEQ ID NO: 192 N-terminal activado con una cisteína libre cerca de su extremo C se recolectó en el flujo pasante.

[000435] Exenatida y vehículos activados con maleimida (sulfhidrilo-proteína de SEQ ID NO: 191 o sulfhidrilo-proteína de SEQ ID NO: 192) se mezclaron en cantidades molares iguales y después se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. La pureza de complejo de SEQ ID NO: 192-Exenatida reticulado con SMCC se evaluó en un gel SDS teñido con Coomassie. El complejo fue aproximadamente el peso molecular correcto y tubo >90% de pureza (figura 26). El constructo de suministro reticulado entonces se almacenó 4°C.

EJEMPLO 15

Transcitosis *In vivo* de Constructos de suministro de Exenatida

[000436] Los constructos de suministro se probaron para el transporte epitelial intestinal como sigue: ratas Sprague

Dawley^{MR} tipo silvestre (~200 – 250 gramos, ~ 6 semanas de edad, adquiridas de Charles River) se pusieron en ayuno durante la noche para limpiar sus intestinos. Se prepararon los siguientes materiales: tubos de microfuga que contienen 4% de formaldehído, tubos para conservación de tejido, tubos de microfuga para recolección de sangre, tubos de microfuga para recolección de suero, PBS, y artículo de prueba. Los animales se prepararon para el experimento al anestesiarlos con Isofluorano y se afeitaron sus abdómenes. Cuatro inyecciones se prepararon para cada animal (2 para el yeyuno y para el colon). Se abrió la cavidad abdominal. Los sitios de inyección se situaron y se marcaron con colores distintivos. Los artículos de prueba se inyectaron lentamente en el lumen durante 10 minutos para el colon y 40 minutos para el yeyuno. Los animales recibieron 35 µg de proteína por inyección en la concentración de 1 µg/µL. Los animales se sacrificaron a 50 minutos. La sangre terminal se recolectó a través de la punción cardíaca. El yeyuno y el colon se removieron y se colocaron en una superficie de trabajo recubierta con plástico. Los contenidos del yeyuno y el colon se lavaron usando PBS y se eliminaron. Una longitud de 1 cm del intestino se escindió del sitio de inyección. El tejido escindido se cortó a la mitad. Una sección se colocó en 4% de formaldehído. El tejido restante entonces se cortó a lo largo y se colocó inmediatamente en un tubo de microfuga y se

congeló. Este proceso se repitió para todos los sitios de inyección. El hígado (~1cm^3) se removió y se dividió en 2 piezas. Para almacenamiento, una sección del hígado se colocó en formaldehído y una segunda se congeló inmediatamente. Las muestras intestinales, de hígado y suero de sangre se recolectaron a 40 min después de la inyección. Las muestras de sangre se centrifugaron y el suero resultante se transfirió a un contenedor para almacenamiento. Las muestras se transportaron sobre hielo seco y se almacenaron a -80°C. La estrategia de dosificación fue como sigue: SEQ ID NO: 192-Exenatida 100 µL, 490 pmol / 29,4 µg (4,9 µM); SEQ ID NO: 191-Exenatida 100 µL, 490 pmol / 30,9 µg (4,9 µM); SEQ ID NO: 195, 100 µL, 490 pmol/2 µg (4,9 µM).

[000437] El análisis bioanalítico del transporte epitelial intestinal de SEQ ID NO: 192-Exenatida, SEQ ID NO: 191-Exenatida, y SEQ ID NO: 195 (Exenatida) se llevó a cabo usando un equipo Exendina-4 ELISA (Phoenix Pharma, Cat# EK-070-94) como sigue: las muestras de tejido se obtuvieron de Brains On-line; 300 µL de amortiguador de ensayo (1X) se agregaron a cada tubo que contiene una muestra de tejido; el tejido se removió del amortiguador de ensayo y se colocó en una placa de tapa de cultivo de células limpias, estéril; las muestras intestinales se rasparon suavemente con un raspador de células, siendo cuidadosos para evitar la recolección del mesenterio; las muestras de hígado se trataron en una manera

similar con maceración y homogenización adicional; el homogenado celular resultante se transfirió de nuevo al tubo original; las muestras de tejido restantes y el área de trabajo se lavaron con 100 µL de amortiguador (2x); la solución homogenada celular se centrifugó en fuerza máxima durante 5 minutos; el sobrenadante se aplicó a una placa ELISA, que se procesó de acuerdo con las instrucciones del fabricante; el sobrenadante restante se almacenó a -20°C para uso posterior.

[000438] Como se representa en la figura 27, el transporte de tanto SEQ ID NO: 192-Exenatida como SEQ ID NO: 191-Exenatida a través de las células epiteliales intestinales se observó a 10 minutos y a 40 minutos. Por otra parte, tanto el SEQ ID NO: 192-Exenatida como SEQ ID NO: 191-Exenatida se transportaron en una tasa más alta que SEQ ID NO: 195 (Exenatida) solo, especialmente a 40 minutos.

EJEMPLO 16

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

[000439] Este ejemplo muestra que los ligadores de aminoácidos de varias longitudes y el acoplamiento de una carga útil heteróloga al extremo N de un vehículo no impactan significativamente a la capacidad de la carga útil para unirse a su diana cuando se incluye en un constructo de

suministro.

[000440] El ensayo de dimerización de receptor de IL-22 se realizó al sembrar células HEK293 DiscoverX e incubar las células durante 16 h (5,000 células por concavidad) utilizando las concentraciones mostradas de agonista (constructo de suministro que contiene la carga útil de IL-22). La luminiscencia de criterio de valoración se leyó en un lector de placas utilizando el Ensayo de Dimerización PathHunter^{MR} eXpress IL22RA1/IL10RB.

[000441] La figura 28A muestra que la longitud de los espaciadores de aminoácidos con SEQ ID NO: 175, 196 y 197 no impactó a la capacidad de IL-22 (NO de SEQ ID: 142) cuando se incluye en los constructos de suministro con SEQ ID NO: 147, 198 y 199 para inducir la dimerización de receptor de IL-22. La inducción de la dimerización de receptor de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22, SEQ ID NO: 143) se muestra en la curva negra.

[000442] La figura 28B muestra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 142) al extremo N o al extremo C del vehículo que comprende residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 mediante el espaciador con SEQ ID NO: 196 no cambió significativamente la capacidad de los constructos de suministro SEQ ID NO: 198, 200 y 201 para inducir la dimerización de receptor de IL-22. La inducción de la dimerización de receptor de IL-22 humana recombinante de

control (rhIL-22) se muestra en la curva negra.

[000443] El ensayo de activación de pSTAT3 se llevó a cabo utilizando células de Colo205 incubadas con 10 µL de agonista (el respectivo constructo de suministro o control de IL-22) que tenían las diversas concentraciones durante 15 min. El grado de activación de pSTAT3 entonces se leyó utilizando placas MSD STAT3 (Cat. No. N450SMA-1).

[000444] La figura 28C muestra que la longitud de los espaciadores de aminoácidos con SEQ ID NO: 175, 196 y 197 no impactó a la capacidad de IL-22 (NO de SEQ ID: 142) cuando se incluye en los constructos de suministro con SEQ ID NO: 147, 198 y 199 para inducir la activación de pSTAT3. La activación de pSTAT3 de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22, SEQ ID NO: 143) se muestra en la curva negra.

[000445] La figura 28D muestra que el acoplamiento de la carga útil de IL-22 (SEQ ID NO: 142) al extremo N o al extremo C del vehículo que comprende residuos de aminoácidos 1-266 de SEQ ID NO: 1 mediante el espaciador con SEQ ID NO: 196 no cambió significativamente la capacidad de los constructos de suministro SEQ ID NO: 198, 200 y 201 para inducir la activación de pSTAT3. La activación de pSTAT3 de IL-22 humana recombinante de control (rhIL-22) se muestra en la curva negra.

[000446] Todos los artículos y métodos descritos y reclamados en la presente se pueden hacer y ejecutar sin

experimentación indebida en vista de la presente descripción. Mientras que los artículos y métodos de esta descripción se han descrito en términos de modalidades, será evidente para aquellos de experiencia en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los artículos y métodos sin apartarse del espíritu y alcance de la descripción. Todas estas variaciones y equivalentes evidentes para aquellos expertos en la técnica, ya sea ahora existentes o después desarrollada se consideran que están dentro del espíritu y alcance de la descripción como se define por las reivindicaciones adjuntas. Todas las patentes solicitudes de patente, y publicaciones mencionadas en la especificación son indicativas de los niveles de aquellos de experiencia ordinaria en la técnica a la cual la descripción pertenece. Todas las patentes, solicitudes de patente, y publicaciones se incorporan en la presente a manera de referencia en su totalidad para todos los propósitos y al mismo grado como si cada publicación individual se hubiera indicado específica e individualmente que se incorpora a manera de referencia en su totalidad para cualquiera y todos los propósitos. La descripción descrita ilustrativamente en la presente se puede practicar adecuadamente en la ausencia de cualquiera de los elementos no descritos específicamente en la presente. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como término de descripción y no de limitación, y no existe intensión de que

en el uso de estos términos y expresiones para excluir cualquiera de los equivalentes de las características mostradas o descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que varias modificaciones son posibles dentro del alcance de la descripción reclamada. De esta manera, cabe destacar que aunque la presente descripción se ha descrito específicamente por las modalidades y características opcionales, la modificación y variación de los conceptos descritos en la presente se pueden recurrir por aquellos expertos en la técnica, y que estas modificaciones y variaciones se consideran que están dentro del alcance de esta descripción como se define por las reivindicaciones adjuntas.