

CITOCINAS ACTIVABLES POR PROTEASA Y MÉTODOS PARA ELABORAR Y USAR
LAS MISMAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

Esta solicitud reivindica el beneficio a la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. de serie 63/607.898, presentada el 8 de diciembre de 2023, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

10

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS ELECTRÓNICO

El contenido del listado de secuencias electrónico (95KG-385485-WO.xml; tamaño: 2.427.153 bytes; y fecha de creación: 5 de diciembre de 2024) se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

15

ANTECEDENTES

Las citocinas tienen el potencial de tratar una variedad de enfermedades o afecciones. Sin embargo, la utilidad terapéutica de las citocinas puede ser limitada debido a la toxicidad celular, la vida media corta, la necesidad de dosis repetitivas o frecuentes, y el potencial de provocar una respuesta inmune no deseada en los pacientes.

La mayoría de los productos de citocinas en el ámbito clínico son extremadamente potentes. Las interleucinas, tales como IL-2 e IL-12, y el IFN- α son citocinas producidas principalmente por células del sistema inmune para señalar y organizar la respuesta inmunitaria. En el cáncer, las citocinas facilitan la capacidad del sistema inmune de reconocer las células tumorales como anormales y dañinas para el huésped. Las citocinas aumentan aún más la proliferación, mejoran la supervivencia, y dirigen a una variedad de

tipos de células inmunes para infiltrarse en el microambiente tumoral y promover potentes respuestas inmunes antitumorales que resultan en la muerte de células tumorales y la eliminación del tumor. Esto limita las aplicaciones prácticas de las citocinas en un entorno terapéutico, particularmente en indicaciones contra el cáncer.

5 Se ha reconocido en particular que la interleucina-12 (IL-12) tiene potencial para ser una carga útil ideal para la inmunoterapia tumoral. Puede activar tanto los componentes innatos como los adaptativos del sistema inmune. IL-12 estimula la producción de IFN- γ y activa las células NK, así como las células T CD8+ y CD4+. Además, esta citocina también induce quimiocinas antiangiogénicas, remodelación de la matriz extracelular del tumor y
10 estimulación de la expresión de moléculas MHC de clase I, lo que la convierte en un candidato anticancerígeno extremadamente atractivo. Sin embargo, aunque los investigadores han mostrado datos preclínicos alentadores, el perfil de toxicidad grave de esta citocina ha impedido el aumento de la dosis y ha frenado significativamente el potencial clínico como un agente anticancerígeno. Aunque se han realizado múltiples
15 ensayos clínicos desde el primer ensayo clínico en humanos de IL-12 en 1996, aún no se ha logrado un producto de IL-12 aprobado por la FDA.

Esto plantea una importante necesidad insatisfecha de nuevas estrategias que puedan superar los desafíos del índice terapéutico para el uso de citocinas como agentes anticancerígenos. Si se pudiera aprovechar de manera segura la potencia de las citocinas
20 como IL-12 y controlar los desafíos de toxicidad, estos agentes podrían servir como terapias poderosas para su posible uso contra un amplio espectro de cánceres.

BREVE DESCRIPCIÓN

25 La presente descripción proporciona, entre otras cosas, una proteína de fusión que comprende una citocina, un enlazador que comprende un segmento de liberación escindible por proteasa, y un polipéptido de máscara, en donde el enlazador que

comprende el segmento de liberación se posiciona entre la citocina y el polipéptido de máscara, y en donde el segmento de liberación es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor. Los aspectos descritos en la presente abordan una necesidad insatisfecha y largamente sentida de citocinas activables para terapias contra el cáncer, que tengan un índice terapéutico aumentado.

Varias características de esta descripción se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente descripción mediante referencia a la siguiente descripción detallada que establece modalidades ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención, y las figuras adjuntas.

SUMARIO

En un aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende: una citocina, un enlazador (Enlazador 1) que comprende un segmento de liberación escindible por proteasa (RS1) y un polipéptido de máscara (Máscara 1), en donde el enlazador (Enlazador 1) que comprende el segmento de liberación (RS1) está posicionado entre la citocina y el polipéptido de máscara (Máscara 1); en donde el segmento de liberación es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor; y en donde el segmento de liberación (RS1) (i) no es capaz de ser escindido por legumaína en el plasma humano, (ii) ser escindido por legumaína en el plasma humano a una tasa que es menor que 25 % de la tasa que EAGRSANHTPAGLTGP (RSR-2295; (sec. con núm. de ident.: 7048) ser escindido por legumaína en el plasma humano, o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia EAGRSAXHTPAGLTGP, en donde X es cualquier aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 7627).

En algunas modalidades, la citocina es una interleucina, un factor de crecimiento transformante, un interferón, un factor de necrosis tumoral, una quimiocina, o un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

En algunas modalidades, la citocina es una interleucina. En algunas modalidades, la interleucina se selecciona de 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-21, e IL-25. En algunas modalidades, la interleucina es IL-12. En algunas modalidades, la IL-12 es un heterodímero unido por disulfuro que comprende un polipéptido p35 y un polipéptido p40, y en donde el enlazador y la máscara se unen covalentemente a (i) el N-terminal o el C-terminal del polipéptido p35, o (ii) el N-terminal o el C-terminal del polipéptido p40.

En un aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende: (a) una primera subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación de N-terminal a C-terminal o C-terminal a N-terminal: i. un primer polipéptido de máscara (Máscara 1), ii. un primer enlazador (Enlazador 1) que comprende un primer segmento de liberación escindible por proteasa (RS1), iii. un polipéptido p35 de IL-12, iv. un segundo enlazador (Enlazador 2) que comprende un segundo segmento de liberación escindible por proteasa (RS2), y v. un segundo polipéptido de máscara (Máscara 2); y (b) una segunda subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación N-terminal a C-terminal o C-terminal a N-terminal: i. un tercer polipéptido de máscara (Máscara 3), ii. un tercer enlazador (Enlazador 3) que comprende un tercer segmento de liberación escindible por proteasa (RS3), iii. un polipéptido p40 de IL-12, iv. un cuarto enlazador (Enlazador 4) que comprende un cuarto segmento de liberación escindible por proteasa (RS4), y v. un cuarto polipéptido de máscara (Máscara 4); en donde el polipéptido p35 de IL-12 de la primera subunidad de polipéptidos y el polipéptido p40 de IL-12 de la segunda subunidad de polipéptidos se unen por disulfuro, formando de esta manera un heterodímero unido por disulfuro; en donde cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente

en un tumor; y en donde cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) (i) no es capaz de ser escindido por legumaína en el plasma humano, (ii) ser escindido por legumaína en el plasma humano a una tasa que es menor que 25 % de la tasa que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; (sec. con núm. de ident.: 7048) ser escindido por legumaína en el plasma humano, o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia EAGRSAXHTPAGLTGP, en donde X es cualquier aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 7627).

En algunas modalidades, el primer polipéptido de máscara (Máscara 1) comprende un primer fragmento de código de barras (Código de barras 1), el segundo polipéptido de máscara (Máscara 2) comprende un segundo fragmento de código de barras (Códigos de barras 2), el tercer polipéptido de máscara (Máscara 3) comprende un tercer fragmento de código de barras (Códigos de barras 3), y el cuarto polipéptido de máscara (Máscara 4) comprende un cuarto fragmento de código de barras (Códigos de barras 4); y en donde cada fragmento de código de barras (Código de barras 1, Código de barras 2, Código de barras 3, y Código de barras 4) se puede liberar de la proteína de fusión tras la digestión con una proteasa no mamífera, y cada fragmento de código de barras difiere tanto en secuencia como en peso molecular de todos los demás fragmentos de código de barras o fragmentos de péptidos que se pueden liberar de la proteína de fusión tras la digestión completa de la proteína de fusión por la proteasa no mamífera.

En un aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende: (a) una primera subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación de N-terminal a C-terminal o C-terminal o N-terminal: i. un primer polipéptido de máscara (Máscara 1) que comprende un primer fragmento de código de barras (Código de barras 1), ii. un primer enlazador (Enlazador 1) que comprende un primer segmento de liberación escindible por proteasa (RS1), iii. un polipéptido p35 de IL-12, iv. un segundo enlazador (Enlazador 2) que comprende un segundo segmento de liberación escindible por proteasa (RS2), y v. un segundo polipéptido de máscara (Máscara 2) que comprende un

segundo fragmento de código de barras (Código de barras 2); y (b) una segunda subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación de N-terminal a C-terminal o C-terminal a N-terminal: i. un tercer polipéptido de máscara (Máscara 3) que comprende un tercer fragmento de código de barras (Código de barras 3), ii. un tercer
5 enlazador (Enlazador 3) que comprende un tercer segmento de liberación escindible por proteasa (RS3), iii. un polipéptido p40 de IL-12, iv. un cuarto enlazador (Enlazador 4) que comprende un cuarto segmento de liberación escindible por proteasa (RS4), y v. un cuarto polipéptido de máscara (Máscara 4) que comprende un cuarto fragmento de código de barras (Barcode4); en donde el polipéptido p35 de IL-12 de la primera subunidad y el
10 polipéptido p40 de IL-12 de la segunda unidad se unen por disulfuro formando de esta manera un heterodímero unido por disulfuro; en donde cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor; y en donde cada fragmento de código de barras (Código de barras 1, Código de barras 2, Código de barras 3, y Código de barras 4) se puede liberar de la proteína de
15 fusión tras la digestión con una proteasa no mamífera, y cada fragmento de código de barras difiere tanto en secuencia como en peso molecular de todos los demás fragmentos de código de barras o fragmentos de péptidos que se pueden liberar de la proteína de fusión tras la digestión completa de la proteína de fusión por la proteasa no mamífera.

En algunas modalidades, cada segmento de liberación comprende una secuencia de
20 aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia de la Tabla 6a.

En algunas modalidades, cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) (i) no es capaz de ser escindido por legumaína en el plasma humano, (ii) ser escindido por legumaína en el plasma humano a una velocidad que es menor que 25 % de la velocidad
25 que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; (sec. con núm. de ident.: 7048) ser escindido por legumaína en el plasma humano, o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que

comprende la secuencia EAGRSAXHTPAGLTGP, en donde X es cualquier aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 7627).

En algunas modalidades, cada segmento de liberación es un sustrato para al menos una proteasa de la Tabla 5.

- 5 En algunas modalidades, cada segmento de liberación es capaz de ser escindido por uPA, ST14, MMP2, MMP7, MMP9, y MMP14.

En algunas modalidades, cada segmento de liberación no es capaz de ser escindido por legumaína en plasma humano.

- 10 En algunas modalidades, cada segmento de liberación no es capaz de ser escindido por legumaína en sangre, plasma o suero humanos.

En algunas modalidades, cada segmento de liberación no es capaz de ser escindido tras la incubación con aproximadamente 1 mM o menos legumaína durante aproximadamente 20 horas.

- 15 En algunas modalidades, cada segmento de liberación se escinde por legumaína en el plasma humano a una tasa que es menor que 25 %, menor que 15 %, menor que 10 %, menor que 5 %, o menor que 2,5 % de la tasa que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; sec. con núm. de ident.: 7048) es escindido por legumaína en plasma humano.

En algunas modalidades, cada segmento de liberación comprende la secuencia de aminoácidos de RSR-3213 (EAGRSASHTPAGLTGP; sec. con núm. de ident.: 7628)

- 20 En algunas modalidades, cada polipéptido de máscara es un polipéptido no natural de longitud extendida (ELNN, por sus siglas en inglés).

En algunas modalidades, cada ELNN se caracteriza, independientemente, porque: al menos 90 % de los residuos de aminoácidos de cada ELNN se seleccionan de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de

- 25 estos; y cada ELNN comprende al menos 3 tipos de residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, cada ELNN, independientemente, comprende una pluralidad de motivos de secuencia no superpuestos que tienen cada uno de 9 a 14 residuos de aminoácidos de longitud, en donde la pluralidad de motivos de secuencia no superpuestos comprende un conjunto de motivos de secuencia no superpuestos, en donde cada motivo de secuencia no superpuesto del conjunto de motivos de secuencia no superpuestos se repite al menos dos veces en el ELNN.

En algunas modalidades, la pluralidad de motivos de secuencia no superpuestos comprende al menos un motivo de secuencia no superpuesto que aparece solo una vez dentro del ELNN.

En algunas modalidades, los motivos de secuencia no superpuestos comprenden uno o cualquier combinación de los motivos de secuencia enumerados en la Tabla 1b.

En algunas modalidades, los motivos de secuencia no superpuestos comprenden al menos 2, 3, o 4 de los motivos de secuencia enumerados en la Tabla 1b.

En algunas modalidades, los motivos de secuencia no superpuestos comprenden una cualquiera de o cualquier combinación de GTSTEPSEGSAP (sec. con núm. de ident.: 189), GTSESATPESGP (sec. con núm. de ident.: 188), GSGPGTSESATP (sec. con núm. de ident.: 201), GSEPATSGSETP (sec. con núm. de ident.: 187), GSPAGSPTSTEE (sec. con núm. de ident.: 186), y GTSPSATPESGP (sec. con núm. de ident.: 202).

En algunas modalidades, cada ELNN comprende al menos 4 tipos de residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos de cada ELNN consisten en A, E, G, S, P, y/o T.

En algunas modalidades, cada ELNN, independientemente, tiene una longitud de al menos 100 residuos de aminoácidos, al menos 200 residuos de aminoácidos, o al menos 250 residuos de aminoácidos.

En algunas modalidades, cada ELNN, independientemente, tiene una longitud de 100 a 1000 residuos de aminoácidos, 100 a 500 residuos de aminoácidos, 200 a 100 residuos de

aminoácidos, 200 a 500 residuos de aminoácidos, 200 a 300 residuos de aminoácidos, 250 a 1000 residuos de aminoácidos, 250 a 500 residuos de aminoácidos, o 250 a 300 residuos de aminoácidos.

En algunas modalidades, cada ELNN tiene una longitud de entre 250 y 300 residuos de aminoácidos.

En algunas modalidades, cada ELNN tiene una longitud de 287 o 288 residuos de aminoácidos.

En algunas modalidades, cada ELNN comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos enumerada en la Tabla 3a o 3b.

En algunas modalidades, la primera máscara de polipéptido es un primer ELNN (ELNN1), y en donde ELNN1 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o un 100 % de

ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT (sec.
con núm. de ident.: 8026).

En algunas modalidades, la segunda máscara de polipéptido es un segundo ELNN (ELNN2), y en donde ELNN2 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o un 100 % de

ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE
PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS

EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
 TSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP
 GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA (sec.
 con núm. de ident.: 8028).

- 5 En algunas modalidades, la tercera máscara de polipéptido es un tercer ELNN (ELNN3), y
 en donde ELNN3 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o un 100 %
 de identidad con:

ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPATSESATPGTSESATPESGPGSEPAT
 10 SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
 ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
 ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
 SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT (sec.
 con núm. de ident.: 8023).

- 15 En algunas modalidades, la cuarta máscara de polipéptido es un cuarto ELNN (ELNN4), y
 en donde ELNN4 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o un 100 %
 de identidad con:

ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST
 20 EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT
 SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
 GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG
 PGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG (sec.
 con núm. de ident.: 8025).

- 25 En algunas modalidades, el polipéptido p35 de IL-12 es un polipéptido p35 de IL-12 humano y el polipéptido p40 de IL12 es un polipéptido p40 de IL-12 humano.

En algunas modalidades, el polipéptido p35 de IL-12 humano comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o un 100 % de identidad con:

RNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTV
5 EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI
RAVTIDRVMSYLNAS (sec. con núm. de ident.: 8050).

En algunas modalidades, el polipéptido p35 de IL-12 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

10 RNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTV
EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI
RAVTIDRVMSYLNAS (sec. con núm. de ident.: 8050).

En algunas modalidades, el polipéptido p35 de IL-12 humano es una variante glicosilada N195.

En algunas modalidades, el polipéptido p35 de IL-12 humano comprende la secuencia de aminoácidos de:

RNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTV
EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN
20 AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI
RAVTIDRVMSYXAS (sec. con núm. de ident.: 8055), en donde X es cualquier residuo de aminoácido distinto de asparagina (N).

En algunas modalidades, el polipéptido p35 de IL-12 humano comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

25 RNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTV
EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI

RAVTIDRVMSYLSSA (sec. con núm. de ident.: 8052);

RNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTV
EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI

5 RAVTIDRVMSYLQAS (sec. con núm. de ident.: 8053); y

RNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTV
EACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMN
AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRI

RAVTIDRVMSYLDAS (sec. con núm. de ident.: 8054).

10 En algunas modalidades, el polipéptido p40 de IL-12 humano comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o un 100 % de identidad con:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF
GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFT

15 CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCQEDSAC
PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD
TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSW
SEWASVPCS (sec. con núm. de ident.: 8051).

En algunas modalidades, el polipéptido p40 de IL-12 humano comprende la secuencia de

20 aminoácidos de:

IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVLTCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEF
GDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFRLRCEAKNYSGRFT

CWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSVEQCQEDSAC
PAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPD
25 TWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSW
SEWASVPCS (sec. con núm. de ident.: 8051).

En algunas modalidades, el polipéptido p35 de IL-12 es un polipéptido p35 de IL-12 de ratón y el polipéptido p40 de IL -12 es un polipéptido p40 de IL-12 de ratón.

En algunas modalidades, cada enlazador comprende además un espaciador.

En algunas modalidades, cada espaciador se posiciona entre un segmento de liberación y una citocina, un polipéptido p35 de IL-12 o un polipéptido p40 de IL-12.

En algunas modalidades, cada espaciador se caracteriza, independientemente, porque: al menos 90 % de los residuos de aminoácidos de cada espaciador se seleccionan de glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E), prolina (P), o cualquier combinación de estos; y cada espaciador comprende al menos 3 tipos de residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, cada espaciador tiene, independientemente, de 5 a 14 residuos de aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, cada espaciador comprende al menos 4 tipos de residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E, y P.

En algunas modalidades, los residuos de aminoácidos de cada espaciador comprenden solo residuos de aminoácidos seleccionados de G, A, S, T, E, y/o P.

En algunas modalidades, cada espaciador es escindible por una proteasa no mamífera.

En algunas modalidades, la proteasa no mamífera es Glu-C.

En algunas modalidades, cada espaciador, independientemente, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla C.

En algunas modalidades, cada espaciador, independientemente, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad con TSESATPES (sec. con núm. de ident.: 98), GTATPESGPG (sec. con núm. de ident.: 97), GTPESATPES (sec. con núm. de ident.: 99), o GTATPESAP (sec. con núm. de ident.: 100).

En algunas modalidades, ningún espaciador comparte 100 % de identidad de secuencia con cualquier otro espaciador.

En algunas modalidades, la proteína de fusión no comprende una etiqueta His, en donde una etiqueta His es una secuencia polipeptídica que comprende una cadena ininterrumpida de entre 5 y 12 residuos de histidina.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras se puede liberar de la proteína de fusión tras la digestión con una proteasa no mamífera y la proteasa no mamífera es Glu-C.

En algunas modalidades, ninguno de los fragmentos de código de barras incluye ninguno de los siguientes: el aminoácido N-terminal de la primera subunidad de polipéptidos, el ácido C-terminal de la primera subunidad de polipéptidos, el aminoácido N-terminal de la segunda subunidad de polipéptidos, y el aminoácido C-terminal de la subunidad de polipéptidos.

En algunas modalidades, la totalidad de cada fragmento de código de barras tiene de 5 a 100, 5 a 50, 10 a 100, o 10 a 50 residuos de aminoácidos de cualquiera de los siguientes: el aminoácido N-terminal de la primera subunidad de polipéptidos, el ácido C-terminal de la primera subunidad de polipéptidos, el aminoácido N-terminal de la segunda subunidad de polipéptidos, y el aminoácido C-terminal de la subunidad de polipéptidos.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras tiene, independientemente, al menos 4 residuos de aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras tiene, independientemente, 4 a 20, 5 a 15, 6 a 12, 7 a 10, 8 a 13, 10 a 13, o 11 a 12 residuos de aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras comprende un glutamato en su C-terminal.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras no incluye un segundo glutamato en una posición distinta del C-terminal del fragmento de código de barras, a menos que el segundo glutamato sea seguido inmediatamente por una prolina.

En algunas modalidades, el residuo de aminoácido que es directamente N-terminal de cada
5 fragmento de código de barras en la secuencia de aminoácidos primaria de la proteína de fusión es un glutamato.

En algunas modalidades, el glutamato que es directamente N-terminal de cada fragmento de código de barras no está inmediatamente adyacente a otro glutamato.

En algunas modalidades, ninguno de los fragmentos de código de barras incluye un
10 glutamato que esté inmediatamente adyacente a otro glutamato, si está presente, en el polipéptido de máscara que contiene el fragmento de código de barras.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras se selecciona, independientemente, de la Tabla 2 o la Tabla 3a.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras comprende únicamente
15 residuos de aminoácidos seleccionados de A, E, G, S, P, y T.

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o un 100 % de identidad, con SGPGSGPGTSE (sec. con
núm. de ident.: 78), SGPGTSASATPE (sec. con núm. de ident.: 1029), SGPGSGPATSE
20 (sec. con núm. de ident.: 1028), o SGPGTSPSATPE (sec. con núm. de ident.: 79).

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras se selecciona de las siguientes cuatro secuencias de aminoácidos: SGPGSGPGTSE (sec. con núm. de ident.: 78), SGPGTSASATPE (sec. con núm. de ident.: 1029), SGPGSGPATSE (sec. con núm. de ident.: 1028), o SGPGTSPSATPE (sec. con núm. de ident.: 79).

En algunas modalidades, el primer fragmento de código de barras (Código de barras 1)
25 comprende la secuencia de aminoácidos de SGPGSGPGTSE (sec. con núm. de ident.: 78).

En algunas modalidades, el segundo fragmento de código de barras (Código de barras 2) comprende la secuencia de aminoácidos de SGPGTSASATPE (sec. con núm. de ident.: 1029).

En algunas modalidades, el tercer fragmento de código de barras (Código de barras 3) comprende la secuencia de aminoácidos de SGPGSGPATSE (sec. con núm. de ident.: 1028).

En algunas modalidades, el cuarto fragmento de código de barras (Código de barras 4) comprende la secuencia de aminoácidos de SGPGTSPSATPE (sec. con núm. de ident.: 79).

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende un sitio de escisión de Glu-C que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ATPESGPG (sec. con núm. de ident.: 2223), SGSETPGT (sec. con núm. de ident.: 2242), y GTSESATP (sec. con núm. de ident.: 204).

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SGPE.SGPGXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2001), SGPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2002), SGPE.SGPGXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2003), SGPE.SGPGXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2004), SGPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2005), SGPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2006), SGPE.SGPGXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2007), SGPE.SGPGXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2007), SGPE.SGPGXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2008), SGPE.SGPGXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2009), SGPE.SGPGXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2010), ATPE.SGPGXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2011), ATPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2012), ATPE.SGPGXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2013), ATPE.SGPGXnATSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2014), ATPE.SGPGXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2015), ATPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:

2016), ATPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2017), ATPE.SGPGXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2018), ATPE.SGPGXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2019), ATPE.SGPGXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2020), ATPE.SGPGXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2021),

5 GTSE.SATPXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2022), GTSE.SATPXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2023), GTSE.SATPXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2024), GTSE.SATPXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2025), GTSE.SATPXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2026), GTSE.SATPXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2027), GTSE.SATPXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2028),

10 GTSE.SATPXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2029), GTSE.SATPXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2030), GTSE.SATPXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2031), TTPE.SGPGXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2032), TTPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2033), TTPE.SGPGXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2034), TTPE.SGPGXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2035), TTPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2036),

15 TTPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2037), TTPE.SGPGXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2038), TTPE.SGPGXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2039), TTPE.SGPGXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2040), TTPE.SGPGXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2041),

20 STPE.SGPGXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2042), STPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2043), STPE.SGPGXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2044), STPE.SGPGXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2045), STPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2046), STPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2047), STPE.SGPGXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2048),

25 STPE.SGPGXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2049), STPE.SGPGXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2050), STPE.SGPGXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2051), GTPE.SGPGXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2052),

2052), GTPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2053), GTPE.SGPGXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2054), GTPE.SGPGXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2055), GTPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2056), GTPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2057),

5 GTPE.SGPGXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2058), GTPE.SGPGXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2059), GTPE.SGPGXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2060), GTPE.SGPGXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2061), GTPE.TPGSXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2062), GTPE.TPGSXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2063), GTPE.TPGSXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2064),

10 GTPE.TPGSXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2065), GTPE.TPGSXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2066), GTPE.TPGSXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2067), GTPE.TPGSXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2068), GTPE.TPGSXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2069), GTPE.TPGSXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2070), GTPE.TPGSXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2071),

15 SGSE.TGTPXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2072), SGSE.TGTPXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2073), SGSE.TGTPXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2074), SGSE.TGTPXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2075), SGSE.TGTPXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2076), SGSE.TGTPXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2077),

20 SGSE.TGTPXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2078), SGSE.TGTPXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2079), SGSE.TGTPXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2080), SGSE.TGTPXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2081), GTPE.GSAPXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2082), GTPE.GSAPXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2083), GTPE.GSAPXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2084),

25 GTPE.GSAPXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2085), GTPE.GSAPXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2086), GTPE.GSAPXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2087), GTPE.GSAPXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2088),

2088), GTPE.GSAPXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2089), GTPE.GSAPXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2090), GTPE.GSAPXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2091), EPSE.SATPXnSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2092), EPSE.SATPXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2093), EPSE.SATPXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2094), EPSE.SATPXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2095), EPSE.SATPXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2096), EPSE.SATPXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2097), EPSE.SATPXnGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.: 2098), EPSE.SATPXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2099), EPSE.SATPXnGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.: 2100), o EPSE.SATPXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2101), en donde cada “.” es un sitio de escisión de Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ATPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2102), ATPE.SGPGXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2103), ATPE.SGPGXnATSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2104), GPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2116), ATPE.SGPGXnGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2103), ATPE.SGPGXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2106), ATPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2107), ATPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2102), ATPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2108), ATPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2108), ATPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2102), GTPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2109), GTPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2110), GTPE.SGPGXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2111), GTPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2110), GTPE.TPGSXnSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.: 2112), GTPE.GSAPXnEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.: 2113), ATPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2108), ATPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2108), ATPE.SGPGXnATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2102).

2102), ATPE.SGPGXnGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2108), TTPE.SGPGXnTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2114), o STPE.SGPGXnSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.: 2115), en donde cada “.” es un sitio de escisión de Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 30.

- 5 En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos ATPE.SGPGXnATSE.SATP, en donde “.” es un sitio de escisión de Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 30 (sec. con núm. de ident.: 2104). En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 1 a 20, 5 a 15, 3 a 7, 2 a 5, o 5 a 10. En algunas modalidades, n es 9. En algunas modalidades, n es 4. En algunas modalidades, n es 3.

- En algunas modalidades, Xn es PGTGTSAT (sec. con núm. de ident.: 2233), PGSGPGT (sec. con núm. de ident.: 2221), PGTTGTT (sec. con núm. de ident.: 2241), PGTPPTST (sec. con núm. de ident.: 2235), PGTSPSAT (sec. con núm. de ident.: 2238), PGTGSAGT (sec. con núm. de ident.: 2230), PGTGGAGT (sec. con núm. de ident.: 2228), PGTSPGAT (sec. con núm. de ident.: 2237), PGTSGSGT (sec. con núm. de ident.: 2236), PGTSSAST (sec. con núm. de ident.: 2239), PGTGAGTT (sec. con núm. de ident.: 2227), PGTGSTST (sec. con núm. de ident.: 2232), GSEPATSG (sec. con núm. de ident.: 2224), APGTSTEP (sec. con núm. de ident.: 2222), PGTAGSGT (sec. con núm. de ident.: 2226), PGTSSGGT (sec. con núm. de ident.: 2240), PGTAGPAT (sec. con núm. de ident.: 2225), PGTPGTGT (sec. con núm. de ident.: 2234), PGTGGPTT (sec. con núm. de ident.: 2229), o PGTGSGST (sec. con núm. de ident.: 2231).

- En algunas modalidades, Xn es TSAS (sec. con núm. de ident.: 2214), TGTS (sec. con núm. de ident.: 2211), SGP, TTPG (sec. con núm. de ident.: 2220), TPPT (sec. con núm. de ident.: 2213), TSPS (sec. con núm. de ident.: 2217), TGSA (sec. con núm. de ident.: 2208), TGGA (sec. con núm. de ident.: 2206), TSPG (sec. con núm. de ident.: 2216), TSGS (sec. con núm. de ident.: 2215), TSSA (sec. con núm. de ident.: 2218), TGAG (sec. con núm. de ident.: 2205), TGST (sec. con núm. de ident.: 2210), EPAT (sec. con núm. de

ident.: 2201), GTST (sec. con núm. de ident.: 2202), TAGS (sec. con núm. de ident.: 2204), TSSG (sec. con núm. de ident.: 2219), TAGP (sec. con núm. de ident.: 2203), TPGT (sec. con núm. de ident.: 2212), TGGP (sec. con núm. de ident.: 2207), o TGSG (sec. con núm. de ident.: 2209). En algunas modalidades, Xn es SGP.

- 5 En algunas modalidades, la primera subunidad de polipéptidos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla A1 (sec. con núms. de ident.: 1000-1005).

En algunas modalidades, la primera subunidad de polipéptidos comprende una secuencia
10 de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, para:
ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
15 ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT**EAGRS**
ASHTPAGLTGPGTPESATPESRNLLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTL
EFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM
ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQK
20 SSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTATPESAP**EAGRSASHTPAGL**
TGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP
GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG
25 SETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA
(sec. con núm. de ident.: 1000).

En algunas modalidades, la segunda subunidad de polipéptidos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia enumerada en la Tabla A2 (sec. con núms. de ident.: 1033-1036).

- 5 En algunas modalidades, la segunda subunidad de polipéptidos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, para:
- ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSESATPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
10 ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT**EAGRS**
ASHTPAGLTGPTSESATPESIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT
LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQK
15 EPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
RGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNL
QLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC
RKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGTATPESGPG**EAGRSASHTPAGLTGP**ATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE
20 GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT
PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES
ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE
SATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG (sec. con núm.
de ident.: 1033).

- 25 En algunas modalidades, la primera subunidad de polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de:
- ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPESGPGSEPAT

SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT**EAGRS**

5 **ASHTPAGLTG**PGTPESATPESRNLPVATPDPGMFCLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTL
EFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM
ALCLSSYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQK
SSLEEPDFYKTIKILCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTATPESA**PEAGRSASHTPAGL**
TGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP

10 GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG
SETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA

(sec. con núm. de ident.: 1000), y en donde la segunda subunidad de polipéptidos

15 comprende la secuencia de aminoácidos de:

ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSESATPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
20 SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT**EAGRS**

ASHTPAGLTGPTSESATPESIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT
LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQK
EPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
RGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNL

25 QLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC
RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGTATPESGP**GEAGRSASHTPAGLTG**PATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE

GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT
PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES
ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE
SATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG (sec. con núm.
5 de ident.: 1033).

En un aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende una
primera subunidad de polipéptidos y una segunda subunidad de polipéptidos, en donde la
primera subunidad de polipéptidos y la segunda subunidad de polipéptidos se unen por
disulfuro formando de esta manera un heterodímero unido por disulfuro, en donde la
10 primera subunidad de polipéptidos comprende una secuencia de aminoácidos que tiene
una identidad de 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, o
una identidad de 100 %, con:

ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
15 ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATEAGRS
ASHTPAGLTGPGTPESATPESRNLPVATPDPMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLE
FYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMA
20 LCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS
SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTATPESAPEAGRSASHTPAGLTG
PATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS
EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG
SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP
25 GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET
PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA (sec.
con núm. de ident.: 1000), y en donde la segunda subunidad de polipéptidos comprende

una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %, o una identidad de 100 % con:

ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSESATPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
5 ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT**EAGRS**
ASHTPAGLTGPTSESATPESIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT
LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHLLLLHKKEDGIWSTDILKDQK
10 EPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV
RGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNL
QLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC
RKNASISVRAQDRYSSSWSEWASVPCSGTATPESGPG**EAGRSASHTPAGLTG**PATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE
15 GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT
PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES
ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE
SATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG (sec. con núm.
de ident.: 1033).

20 En algunas modalidades, la primera subunidad de polipéptidos comprende la secuencia de aminoácidos de:

ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTSESATPESGPGSEPAT
SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS
25 ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG
SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT**EAGRS**
ASHTPAGLTGPGTPESATPESRNLVPVATPDPGMFCLHHSQNLRLRAVSNMLQKARQTL

EFYPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMM

ALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMMLAVIDELMQALNFNSETVPQK

SSLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTATPESAPE**EAGRSASHTPAGL**

TGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP

5 GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG

PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS

APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG

SETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA

(sec. con núm. de ident.: 1000), y en donde la segunda subunidad de polipéptidos

10 comprende la secuencia de aminoácidos de:

ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSESATPGTSESATPESGPGSEPAT

SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP

ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS

ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG

15 SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT**EAGRS**

ASHTPAGLTGPTSESATPESIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT

LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLHKKEDGIWSTDILKDQK

EPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERV

RGDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNL

20 QLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC

RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCSGTATPESGPG**EAGRSASHTPAGLTGP**ATPE

SGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE

GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT

PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES

25 ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE

SATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG (sec. con núm.

de ident.: 1033).

En un aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende la fusión descrita en la presente y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la descripción proporciona una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión descrita en la presente.

- 5 En un aspecto, la descripción proporciona un vector de expresión que comprende la secuencia de polinucleótidos descrita en la presente.

En un aspecto, la descripción proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión descrito en la presente.

- En un aspecto, la descripción proporciona un método para producir la proteína de fusión descrita en la presente. En algunas modalidades, el método comprende además aislar la proteína de fusión de una célula huésped.

- En un aspecto, la descripción proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, el método que comprende administrar una cantidad efectiva de la proteína de fusión descrita en la presente o la composición farmacéutica descrita en la presente al sujeto.

En algunas modalidades, el cáncer comprende un tumor sólido.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 20 La **Figura 1** ilustra un esquema de una proteína de fusión de IL-12 activable por proteasa.

- La **Figura 2** ilustra las curvas del ensayo de actividad de IL-12R de varias proteínas de fusión de citocinas activables por proteasas basadas en la capacidad de unirse y activar IL-12R en células reporteras de IL-12 HEK-Blue. "X.AP#####" se refiere a la proteína de fusión enmascarada y "AP#####" se refiere a la proteína de fusión MMP9 desenmascarada o parcialmente desenmascarada.

La **Figura 3** ilustra las curvas del ensayo de actividad de IL-12R de varias proteínas de fusión de citocinas activables por proteasas basadas en la capacidad de unirse y activar

IL-12R en células reporteras de IL-12 HEK-Blue. “X.AP#####” se refiere a la proteína de fusión enmascarada y “AP#####” se refiere a la proteína de fusión MMP9 desenmascarada o parcialmente desenmascarada.

La **Figura 4** ilustra las curvas del ensayo de actividad de IL-12R de varias proteínas de fusión de citocinas activables por proteasas basadas en la capacidad de unirse y activar IL-12R en células reporteras de IL-12 HEK-Blue. “X.AP#####” se refiere a la proteína de fusión enmascarada y “AP#####” se refiere a la proteína de fusión MMP9 desenmascarada o parcialmente desenmascarada. Se usa IL-12 murino recombinante como referencia.

La **Figura 5** ilustra una curva de ensayo de actividad de IL-12R de una proteína de fusión de citocina activable por proteasa cuádruplemente enmascarada y su contraparte no enmascarada, basada en la capacidad de unirse y activar IL-12R en células reporteras HEK-Blue IL-12. Se usa IL-12 murino recombinante como referencia.

La **Figura 6** ilustra datos de ensayos *in vitro* de esplenocitos de ratón que comparan proteínas de fusión de citocinas activables por proteasa: P26M (que tiene 4 ELNN de 210 aminoácidos) a P24M (que tiene 4 ELNN de 288 aminoácidos).

La **Figura 7** ilustra el volumen del tumor medio de ratones de modelo tumoral B16F10 tratados con P26M (que tiene 4 ELNN de 210 aminoácidos) o P24M (que tiene 4 ELNN de 288 aminoácidos) a 3 µg QW, en comparación con el diluyente. También se proporciona un diagrama de dispersión del volumen del tumor medio en el día 21 del mismo experimento.

La **Figura 8** ilustra un esquema de una proteína de fusión de IL-12 activable por proteasa con fragmentos de código de barras (C-35 BC; N-35 BC; C-40 BC, y N-40 BC) incorporados a los ELNN.

La **Figura 9A** ilustra una alineación de las secuencias de aminoácidos RSR-2295 y RSR-3213 y las proteasas capaces de escindirlas. La **Figura 9B** ilustra la digestión con proteasa *in vitro* de proteínas de fusión de acopladores de células T activables por proteasa (paTCE, por sus siglas en inglés) empleando RSR-2295 o RSR-3213. La secuencia RSR-3213 se

modifica para reducir sustancialmente la escisión por legumafina. paTCE se refiere a la proteína de fusión intacta que tiene dos ELNN (N-terminal y C-terminal) que flanquean un núcleo TCE biespecífico. TCE desenmascarado (uTCE) se refiere al núcleo de TCE desenmascarado. 1x-C y 1x-N se refieren a los metabolitos enmascarados simples de C-terminal o N-terminal, respectivamente.

La **Figura 10A** y la **Figura 10B** ilustran la estabilidad plasmática relativa de los paTCE que emplean RSR-2295 o RSR-3213, medidos el día 0 y el día 7. En la Figura 10A, el RSR-2295 empleó el fluoróforo SCy5.5 y RSR-3213 empleó el fluoróforo Scy7.5. En la Figura 10B, el RSR-2295 empleó el fluoróforo Scy7.5 y el RSR-3213 empleó el fluoróforo Scy5.5.

La **Figura 10C** ilustra la escisión observada *in vivo* a partir de homogeneizados tumorales de 3 modelos de tumores de ratón diferentes. Para cada conjunto de gráficos de barras (es decir, % de 1x-C, % de 1x-N, % de uTCE), cada barra de izquierda a derecha representa B1, B2, B3, B4, A1, A2, A3, A4, 43-1, 43-2, 43-3, y 43-4. B1-B4 representan 4 ratones diferentes de un primer modelo de tumor (NCI-N87). A1-A4 representan 4 ratones diferentes de un segundo modelo de tumor (HT-29). 43-1 – 43-4 representan 4 ratones diferentes de un tercer modelo de tumor (HT-55). La **Figura 10D** ilustra el % del total para los 3 metabolitos más el paTCE (paTCE, 1x-N, 1x-C, y uTCE) cuando se emplea RSR-2295 o RSR-3213.

La **Figura 11** ilustra la captación tumoral relativa de paTCE empleando RSR-2295 o RSR-3213. La relación plasma:tumor se calculó en 3 modelos de tumores de ratón diferentes (4 ratones por modelo de tumor). Hay un “Ratón 1” para cada uno de los 3 modelos de tumores diferentes, un “Ratón 2” para cada uno de los 3 modelos de tumores diferentes, un “Ratón 3” para cada uno de los diferentes modelos de tumores, y un “Ratón 4” para cada uno de los 3 modelos de tumores diferentes.

La **Figura 12** ilustra datos de ensayos *in vitro* de esplenocitos de ratón que comparan proteínas de fusión de citocinas activables por proteasa: P24M (que tiene RSR-3213) a P01M (que tiene RSR-2295).

La **Figura 13** ilustra el volumen del tumor medio de ratones de modelo tumoral B16F10 tratados con P24M (que tiene RSR-3213) o P01M (que tiene RSR-2295) a 3 µg QW, en comparación con el diluyente. También se proporciona un diagrama de dispersión del volumen del tumor medio en el día 21 del mismo experimento.

5 La **Figura 14** ilustra un gráfico de la inducción de IFN γ en un ensayo de esplenocitos de ratón. Se sometieron a pruebas versiones enmascaradas y desenmascaradas de las proteínas de fusión de citocinas activables por proteasa P71M (sustituto de ratón de P72H) y P70M (sustituto de ratón de P74H) en varias concentraciones. Se incluyó IL-12 de ratón recombinante como referencia.

10 La **Figura 15** ilustra datos farmacocinéticos de versiones enmascaradas y desenmascaradas de las proteínas de fusión de citocinas activables por proteasa P70M (sustituto de ratón para P72H) y P71M (sustituto de ratón para P74H) en ratones C57BL/6 después de la administración intravenosa de cada proteína de fusión.

La **Figura 16** ilustra datos de eficacia (medidos por el volumen del tumor) y datos de
15 toxicidad (medidos por la supervivencia) en un modelo de ratón C57BL/6 de carcinoma de colon MC38. Solo se sometieron a pruebas las proteínas de fusión de citocinas activables por proteasa P70M (sustituto de ratón para P72H) y P71M (sustituto de ratón para P74H) en versiones enmascaradas.

La **Figura 17** ilustra la inducción de IFN γ a partir de PBMC incubadas con concentraciones
20 crecientes de proteínas de fusión de citocinas activables por proteasa P72H o P74H, en versiones enmascaradas y desenmascaradas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Existe una importante necesidad insatisfecha en la terapia contra el cáncer de una citocina activable que sea eficaz contra el cáncer. Las proteínas de fusión de la descripción comprenden una citocina a la que se unen una o más (p. ej., dos, tres, o cuatro) máscaras polipeptídicas no estructuradas. En algunas modalidades, estas máscaras polipeptídicas no estructuradas reducen estéricamente la unión diana de la citocina a dicho receptor diana de la citocina (p. ej., se enmascara IL-12 para reducir la unión al receptor de IL-12) y también extienden la vida media de la proteína. En algunas modalidades, las máscaras polipeptídicas no estructuradas son polipéptidos no naturales de longitud extendida (ELNN).

En algunas modalidades, las propiedades de los ELNN también minimizan el potencial de inmunogenicidad, ya que su falta de estructuras terciarias estables desfavorece la unión de citocinas, y la ausencia de residuos hidrófobos, aromáticos y con carga positiva que sirven como residuos de anclaje para la unión del péptido MHC II reduce el potencial de epítopos de células T.

En algunas modalidades, los sitios de escisión de proteasa en la base del (de los) ELNN permiten la activación proteolítica de proteínas de fusión en el microambiente tumoral, liberando citocinas más pequeñas y altamente potentes que son capaces de unirse al receptor diana de dicha citocina. En algunas modalidades, en tejidos sanos, donde la actividad de la proteasa está estrechamente regulada, las proteínas de fusión permanecen predominantemente inactivas, lo que amplía el índice terapéutico en comparación con las citocinas desenmascaradas.

En algunas modalidades, además de la activación localizada, la vida media corta de la forma de citocinas desenmascaradas amplía aún más el índice terapéutico al tiempo que proporciona la potencia de la inmunidad de las células T para mejorar la erradicación de tumores sólidos. En algunas modalidades, los sitios de liberación usados en las proteínas

de fusión se pueden escindir en una amplia gama de tumores mediante proteasas que participan colectivamente en cada característica distintiva del cáncer (crecimiento; supervivencia y muerte; angiogénesis; invasión y metástasis; inflamación; y evasión inmune). Por lo tanto, la actividad de las citocinas de las proteínas de fusión se localiza en los tumores aprovechando la actividad mejorada de la proteasa, que se regula positivamente en todas las etapas del desarrollo del cáncer y del tumor, pero que está estrechamente regulada en los tejidos sanos.

TERMINOLOGÍA

Como se usa en la presente, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique de cualquier otra manera.

Como se usan en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente de cualquier otra manera. Por ejemplo, el término “una célula” incluye una pluralidad de células, incluidas mezclas de estas, a menos que el contexto claramente lo indique de cualquier otra manera.

Además, “y/o” cuando se usa en la presente se debe tomar como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, el término “y/o” como se usa en una frase tal como “A y/o B” en la presente pretende incluir “A y B”, “A o B”, “A” (solo) y “B” (solo). De la misma manera, el término “y/o” tal como se usa en una frase como “A, B, y/o C” pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: “A, B, y C”; “A, B, o C”; “A o C”; “A o B”; “B o C”; “A y C”; “A y B”; “B y C”; “A” (solo); “B” (solo); y “C” (solo).

Se entiende que siempre que en la presente se describen aspectos con el lenguaje “que comprende”, también se proporcionan aspectos análogos descritos en términos de “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”.

Los rangos numéricos incluyen los números que definen el rango. A menos que se indique de cualquier otra manera, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi. Los títulos proporcionados en la presente no constituyen limitaciones de los diversos aspectos de la descripción. En consecuencia, los
5 términos definidos inmediatamente a continuación se definen de forma más completa por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

El término “aproximadamente” se usa en la presente para significar aproximadamente, apenas, alrededor de o en las regiones de. Cuando el término “aproximadamente” se usa junto con un rango numérico, modifica ese rango extendiendo los límites por encima y por
10 debajo de los valores numéricos establecidos. En general, el término “aproximadamente” puede modificar un valor numérico por encima o por debajo del valor establecido mediante una variación de, *p. ej.*, 10 por ciento, hacia arriba o hacia abajo (más alto o más bajo). En algunas modalidades, el término indica una desviación del valor numérico indicado por $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,9\%$, $\pm 0,8\%$, $\pm 0,7\%$, $\pm 0,6\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,4\%$,
15 $\pm 0,3\%$, $\pm 0,2\%$, $\pm 0,1\%$, $\pm 0,05\%$, o $\pm 0,01\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 10\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 5\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 4\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor
20 numérico indicado de $\pm 3\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 2\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 1\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,9\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor
25 numérico indicado de $\pm 0,8\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,7\%$. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,6\%$. En

algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,5$ %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,4$ %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,3$ %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,1$ %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,05$ %. En algunas modalidades, “aproximadamente” indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 0,01$ %.

Con respecto a los compuestos naturales, el término “aislado” se refiere a un compuesto (es decir, un polipéptido o polinucleótido) que no está en su estado nativo (p. ej., libre en diversos grados de los componentes que acompañan naturalmente al compuesto en la naturaleza). No se requiere ningún nivel particular de purificación. Por ejemplo, un polipéptido aislado se puede simplemente extraer de su entorno nativo o natural. Los polipéptidos y proteínas producidos de forma recombinante expresados en células huésped se consideran aislados a los efectos de la descripción, al igual que los polipéptidos nativos o recombinantes que han sido separados, fraccionados o purificados parcial o sustancialmente mediante cualquier técnica adecuada. “Aislar” y “aislado” también pueden denotar un grado de separación de una fuente o entorno original, dependiendo del contexto.

El término “polipéptido” se refiere a cualquier polímero de dos o más aminoácidos. Por lo tanto, los términos péptido, dipéptido, tripéptido, oligopéptido, proteína, cadena de aminoácidos, o cualquier otro término usado para referirse a una cadena de dos o más aminoácidos, se incluyen dentro de la definición de “polipéptido”. El término “polipéptido” también abarca un polímero de aminoácidos que ha sido modificado (p. ej., mediante modificación postraduccional), por ejemplo, mediante formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación, tal como la conjugación con un componente de marcado. Dependiendo del contexto, el término

“polipéptido” también se puede usar para referirse a una proteína que comprende dos o más polímeros de dos o más aminoácidos.

Una “célula huésped” incluye una célula individual (p. ej., en cultivo) que comprende un polinucleótido exógeno. Las células huésped pueden incluir la progenie de una única célula huésped. La progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en la genómica del complemento total de ADN) a la célula parental original debido a variaciones naturales o diseñadas por ingeniería.

Un polipéptido o proteína de “fusión” o “quimérico” comprende una primera porción de polipéptido unida a una segunda porción de polipéptido con la que no está naturalmente unida en la naturaleza. En algunas modalidades, las porciones pueden existir normalmente en proteínas separadas y se reúnen en el polipéptido de fusión; normalmente pueden existir en la misma proteína pero se colocan en una nueva disposición en el polipéptido de fusión; o las porciones pueden provenir de diferentes fuentes. En algunas modalidades, una proteína de fusión o quimérica comprende dos o más fracciones que no existen en la naturaleza (p. ej., son creadas, diseñadas, o generadas de cualquier otra manera por humanos, tales como dominios de unión, máscaras, enlazadores, códigos de barras, y otros polipéptidos proporcionados en la presente). Una proteína quimérica se puede crear, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante expresión recombinante (p. ej., que comprende la creación y traducción de un polinucleótido en el que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada).

“Conjugado”, “unido”, “fusionado” y “fusión” se pueden usar indistintamente en la presente, dependiendo del contexto. Estos términos se pueden referir a la unión covalente de dos o más elementos o componentes químicos (p. ej., polipéptidos), por cualquier medio, incluida la conjugación química o medios recombinantes.

El término “citocina” como se usa en la presente se refiere a cualquiera de una clase de proteínas inmunorreguladoras que son secretadas por células, especialmente del sistema inmunológico, y son inmunomoduladores. Los polipéptidos de citocinas que se pueden usar

en las proteínas de fusión descritas en la presente incluyen, pero no se limitan a, interleucinas, tales como IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (p. ej., IL-12p35 e IL-12p40), IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21 e IL-25, factores de crecimiento transformantes, tales como TGF-alfa y TGF-beta (p. ej., TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3); interferones, tales como interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interferón kappa e interferón omega; factores de necrosis tumoral, tal como factor de necrosis tumoral alfa y linfotoxina; quimiocinas (p. ej., quimiocina con motivo C-X-C 10 (CXCL10), CCL19, CCL20, CCL21) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CS, por sus siglas en inglés), así como fragmentos funcionales de estos que conservan la actividad agonista del receptor.

El término “quimiocina” se refiere a cualquiera de una familia de pequeñas citocinas con la capacidad de inducir quimiotaxis dirigida en células sensibles cercanas.

Como se usa en la presente, los términos “activable”, “activar”, “inducir” e “inducible” se refieren a la capacidad de una proteína, es decir, una citocina, que forma parte de una proteína de fusión, de unirse a su receptor y efectuar actividad tras la escisión de un polipéptido de máscara de la proteína de fusión.

Como se sabe en la técnica, la “identidad de secuencia” entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. De manera similar, la “identidad de secuencia” entre dos polinucleótidos se determina comparando la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido con la secuencia de un segundo polinucleótido. Los términos “% idéntico”, “% de identidad” o términos similares se refieren, en particular, al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos (según corresponda) que son idénticos en una alineación óptima entre las secuencias a comparar. Dicho porcentaje puede ser puramente estadístico, y las diferencias entre las dos secuencias pueden estar, aunque no necesariamente, distribuidas aleatoriamente a lo largo de toda la longitud de las secuencias a comparar. Las comparaciones de dos secuencias generalmente se realizan comparando las secuencias, después de una

alineación óptima, con respecto a un segmento o “ventana de comparación”, para identificar regiones locales de secuencias correspondientes. Por ejemplo, la alineación óptima para una comparación se puede realizar manualmente o con la ayuda del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Adv. App. Math.* 2, 482, con la ayuda del

5 algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, con la ayuda del algoritmo de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88, 2444, o con la ayuda de programas informáticos que usen los algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.). En algunas

10 modalidades, el porcentaje de identidad de dos secuencias se determina usando el algoritmo BLASTN o BLASTP, disponible en el sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) de los EE. UU. (p. ej., en blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq). En algunas modalidades, los parámetros del algoritmo usados para

15 el algoritmo BLASTN en el sitio web de NCBI incluyen: (i) Umbral esperado establecido en 10; (ii) Tamaño de palabra establecido en 28; (iii) Máximo de concordancias en un rango de consulta establecido en 0; (iv) Puntuaciones de concordancias/discordancias establecidas en 1, -2; (v) Costos de brecha establecidos en lineal; y (vi) el filtro para regiones de baja complejidad que se está usando. En algunas modalidades, los parámetros

20 del algoritmo usados para el algoritmo BLASTP en el sitio web de NCBI incluyen: (i) Umbral esperado establecido en 10; (ii) Tamaño de palabra establecido en 3; (iii) Máximo de concordancias en un rango de consulta establecido en 0; (iv) Matriz establecida en BLOSUM62; (v) Costos de brecha establecidos en Existencia: 11 Extensión: 1; y (vi) ajuste de la matriz de puntuación compositiva condicional. Cuando se analiza en la presente, se

25 puede determinar si un polipéptido en particular es al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % idéntico a otro polipéptido usando métodos y programas informáticos/software conocidos en la técnica tales como, pero no

se limitan a, el programa BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se usa BESTFIT o cualquier otro programa de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95 % idéntica a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente descripción, los parámetros se establecen, por supuesto, de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula sobre la longitud completa de la secuencia de polipéptido de referencia y que se permiten brechas en la homología de hasta 5 % del número total de aminoácidos en la secuencia de referencia.

Como se usa en la presente, los términos “polipéptido de máscara”, “máscara” y “fracción de enmascaramiento” se refieren a un polipéptido que es capaz de reducir la unión de una citocina al receptor de citocina diana en el contexto de una proteína de fusión (tal como un polipéptido quimérico) proporcionada en la presente. Los polipéptidos de máscara ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, los polipéptidos de ELNN descritos en la presente. Los polipéptidos de máscara adicionales incluyen albúmina, polipéptidos que consisten en prolina, serina y alanina, dominios en espiral, dominios de unión de albúmina, dominios Fc, y dominios de unión con especificidad para regiones conservadas de un dominio variable de anticuerpo. Los polipéptidos de máscara se describen con más detalle en Lucchi et al. (*ACS Cent Sci.* 26 de mayo de 2021; 7(5): 724–738).

Como se usa en la presente, los términos “polipéptidos de ELNN” y “ELNN” son sinónimos y se refieren a polipéptidos de longitud extendida que comprenden secuencias no naturales, sustancialmente no repetitivas (*p. ej.*, motivos polipeptídicos) que se componen principalmente por pequeños aminoácidos hidrófilos, y la secuencia tiene un grado bajo o nulo de estructura secundaria o terciaria en condiciones fisiológicas. Los polipéptidos de ELNN incluyen polipéptidos hidrófilos no estructurados que comprenden motivos repetidos

de 6 aminoácidos naturales (G, A, P, E, S, y/o T). En algunas modalidades, un polipéptido de ELNN comprende múltiples motivos de 6 aminoácidos naturales (G, A, P, E, S, T), en donde los motivos son los mismos o comprenden una combinación de motivos diferentes. En algunas modalidades, los polipéptidos de ELNN pueden conferir ciertas propiedades farmacocinéticas, fisicoquímicas y farmacéuticas deseables cuando se unen a proteínas, incluidos los activadores de células T como se describe en la presente. Tales propiedades deseables pueden incluir, pero no se limitan a, parámetros farmacocinéticos y características de solubilidad mejorados, así como un índice terapéutico mejorado. Los polipéptidos de ELNN son conocidos en la técnica, y se encuentran descripciones no limitantes relacionadas y ejemplos de polipéptidos de ELNN conocidos como polipéptidos XTEN® disponibles en Schellenberger et al., (2009) *Nat Biotechnol* 27(12):1186-90; Brandl et al., (2020) *Journal of Controlled Release* 327:186-197; y Radon et al., (2021) *Advanced Functional Materials* 31, 2101633 (páginas 1-33), el contenido íntegro de cada uno de ellos se incorpora en la presente como referencia.

En algunas modalidades, la repetitividad de una secuencia de ELNN se refiere a la repetitividad de 3 mer y se puede medir mediante programas informáticos o algoritmos o mediante otros medios conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la repetitividad de 3-mer de un ELNN se puede evaluar determinando el número de apariciones de las secuencias de 3-mer superpuestas dentro del polipéptido. Por ejemplo, un polipéptido de 200 residuos de aminoácidos tiene 198 secuencias superpuestas de 3 aminoácidos (3-mer), pero la cantidad de secuencias de 3-mer únicas dependerá de la cantidad de repetitividad dentro de la secuencia. En algunas modalidades, se puede generar una puntuación (en adelante, “puntuación de subsecuencia”) que refleje el grado de repetitividad de los 3-mer en la secuencia polipeptídica general. En este contexto, “puntuación de subsecuencia” significa la suma de las ocurrencias de cada marco único de 3 mer en una secuencia de 200 aminoácidos consecutivos del polipéptido dividida por el número absoluto de subsecuencias únicas de 3 mer dentro de la secuencia de 200

aminoácidos. Los ejemplos de tales puntuaciones de subsecuencia derivadas de los primeros 200 aminoácidos de polipéptidos repetitivos y no repetitivos se presentan en el Ejemplo 73 de la publicación de solicitud de patente internacional núm. WO 2010/091122 A1, que se incorpora como referencia en su totalidad.

5 En algunas modalidades, y en el contexto de los ELNN, una “secuencia sustancialmente no repetitiva” se refiere a una secuencia de ELNN, en donde (1) hay pocas o ninguna instancia de cuatro aminoácidos idénticos en una fila en la secuencia de ELNN y en donde (2) el ELNN tiene una puntuación de subsecuencia (definida en el párrafo anterior en la presente) de 12, o 10 o menos o que no hay un patrón en el orden, desde N-terminal a C-
10 terminal, de los motivos de secuencia que constituyen la secuencia polipeptídica.

Un “vector” es una molécula de ácido nucleico que transfiere una molécula de ácido nucleico insertada hacia y/o entre células huésped. En algunas modalidades, un vector se autorreplica en un huésped apropiado. El término incluye vectores que funcionan principalmente para la inserción de ADN o ARN en una célula, vectores de replicación que
15 funcionan principalmente para la replicación de ADN o ARN, y vectores de expresión que funcionan para la transcripción y/o traducción del ADN o ARN. También se incluyen vectores que proporcionan más de una de las funciones anteriores. Un “vector de expresión” es un polinucleótido que, cuando se introduce en una célula huésped apropiada, se puede usar para la transcripción de ARNm que se traduce en uno o más polipéptidos.

20 En algunas modalidades, un “sistema de expresión” es una célula huésped adecuada que comprende un vector de expresión que puede funcionar para producir un producto de expresión deseado.

Los términos “tratamiento” o “que trata” y “que mejora” se pueden usar indistintamente en la presente. Estos términos se refieren a un enfoque para obtener resultados beneficiosos
25 o deseados que incluyen, pero no se limitan a, un beneficio terapéutico. Por “beneficio terapéutico” se entiende la erradicación o mejora del trastorno subyacente que se está tratando. En algunas modalidades, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o

mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con la enfermedad subyacente, de tal manera que se observa una mejora en el sujeto, a pesar de que el sujeto aún pueda estar afectado por el trastorno subyacente. En algunas modalidades, un beneficio terapéutico comprende retardar o detener el crecimiento de uno o más tumores.

- 5 En algunas modalidades, un beneficio terapéutico comprende reducir el tamaño de uno o más tumores. En algunas modalidades, un beneficio terapéutico comprende erradicar uno o más tumores de un sujeto. En algunas modalidades, un beneficio terapéutico comprende efectuar la muerte de células cancerosas.

- Como se usa en la presente, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a
10 una cantidad de un agente biológicamente activo (tal como una proteína de fusión proporcionada en la presente, p. ej., como parte de una composición farmacéutica), que es capaz de tener cualquier efecto beneficioso detectable sobre cualquier síntoma, aspecto, parámetro medido o característica de un estado o condición de enfermedad cuando se administra en una o dosis repetidas a un sujeto. Tal efecto no necesita ser absoluto para
15 ser beneficioso. La condición de la enfermedad se puede referir a un trastorno o una enfermedad, p. ej., cáncer o un síntoma de cáncer.

CITOCINAS, SECUENCIAS DE ESCISIÓN, FRAGMENTOS DE CÓDIGO DE BARRAS, Y POLIPÉPTIDOS DE FUSIÓN

- 20 La presente descripción proporciona, *inter alia*, proteínas de fusión nuevas y útiles que comprenden (i) uno o más polipéptidos de máscara (tales como, ELNN), (ii) una citocina (p. ej., IL-12) unida al o los polipéptidos de máscara, y (iii) uno o más segmentos de liberación (RS, por sus siglas en inglés) escindibles por proteasa, en donde un RS se posiciona entre el (los) polipéptido(s) de máscara y la citocina.
- 25 En algunas modalidades, el polipéptido de fusión comprende un primer ELNN (tal como un ELNN descrito en la presente). En algunas modalidades, el polipéptido comprende además un segundo ELNN (tal como un ELNN descrito en la presente). En algunas modalidades,

el polipéptido comprende un ELNN en o cerca de su N-terminal (un “ELNN de N-terminal”). En algunas modalidades, el polipéptido comprende un ELNN en o cerca de C-terminal (un “ELNN de C-terminal”). En algunas modalidades, el polipéptido comprende tanto un ELNN de N-terminal como un ELNN de C-terminal.

5 En algunas modalidades, un polipéptido de fusión comprende una citocina y un primer ELNN se une al N-terminal de la citocina mediante un primer RS y un segundo ELNN se une al C-terminal de la citocina mediante un segundo RS. En algunas modalidades, cada RS es escindible por una proteasa mencionada en la presente. En algunas modalidades, cada RS comprende una secuencia de RS descrita en la presente. En algunas
10 modalidades, el polipéptido de fusión es una fusión de citocina.

Se incluyen en la presente secuencias polipeptídicas que se pueden usar, p. ej., para unir una fracción polipeptídica a otra dentro de una proteína de fusión. Por ejemplo, se proporcionan enlaces útiles que son escindidos por múltiples proteasas pero no por legumaina. En algunas modalidades, tales enlazadores se pueden usar fuera del contexto
15 de citocinas tales como las descritas en la presente.

En algunas modalidades, una fusión puede comprender uno o más fragmentos de código de barras (p. ej., como se describe en la presente) liberables (p. ej., configurados para liberarse) del polipéptido de fusión tras la escisión o digestión del polipéptido de fusión por una proteasa. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa no mamífera. En
20 algunas modalidades, cada fragmento de código de barras difiere en secuencia y peso molecular de todos los demás fragmentos de péptidos (incluidos todos los demás fragmentos de código de barras si están presentes) que se pueden liberar del polipéptido tras la digestión completa del polipéptido por la proteasa, lo que lo hace único y hace que su presencia sea detectable a través de técnicas tales como la espectrometría de masas.

25

CITOCINAS

En general, el uso terapéutico de las citocinas está fuertemente limitado por su toxicidad sistémica. El TNF, por ejemplo, fue descubierto originalmente por su capacidad de inducir la necrosis hemorrágica de algunos tumores y por su efecto citotóxico in vitro sobre diferentes líneas tumorales, pero posteriormente demostró tener una fuerte actividad proinflamatoria, que puede, en caso de condiciones de sobreproducción, afectar peligrosamente al cuerpo humano. Como la toxicidad sistémica es un problema fundamental con el uso de cantidades farmacológicamente activas de citocinas en humanos, actualmente se están evaluando nuevos derivados y estrategias terapéuticas destinadas a reducir los efectos tóxicos de esta clase de efectores biológicos manteniendo al mismo tiempo su eficacia terapéutica.

Una citocina para su uso en la producción de las proteínas de fusión de la descripción es la interleucina-12 (IL-12). La IL-12 es un heterodímero unido por disulfuro de dos subunidades codificadas por separado (p35 y p40), que se unen covalentemente para dar lugar a la denominada molécula heterodímera bioactiva (p70). Además de formar heterodímeros (IL-12 e IL-23), la subunidad p40 también se secreta como un monómero (p40) y como un homodímero (p40₂). Se sabe en la técnica que la síntesis del heterodímero como una cadena única con un conector que conecta la subunidad p35 a la p40 preserva la actividad biológica completa del heterodímero. La IL-12 desempeña un papel fundamental en la respuesta inflamatoria temprana a la infección y en la generación de células Th1, que favorecen la inmunidad mediada por células. Se ha descubierto que la sobreproducción de IL-12 puede ser peligrosa para el huésped porque se involucra en la patogénesis de una serie de enfermedades inflamatorias autoinmunes (p. ej., EM, artritis, diabetes tipo 1).

La IL-12 es una citocina pleiotrópica que crea una interconexión entre la inmunidad innata y la adaptativa. La IL-12 se describió por primera vez como un factor secretado por líneas de células B transformadas por EBV inducidas por PMA. Basada en sus acciones, la IL-12 ha sido

designada como factor de maduración de linfocitos citotóxicos y factor estimulante de células destructoras naturales. Debido a que une la inmunidad innata y adaptativa y estimula potentemente la producción de IFN γ , una citocina que coordina los mecanismos naturales de defensa contra el cáncer, la IL-12 parecía la candidata ideal para la inmunoterapia tumoral en humanos. Sin embargo, los graves efectos secundarios asociados con la administración sistémica de IL-12 en investigaciones clínicas y el índice terapéutico muy estrecho de esta citocina obstaculizaron notablemente el uso de esta citocina en pacientes con cáncer. Los enfoques de la terapia con IL-12 en los que la administración de la citocina se dirige al tumor, lo que puede disminuir algunos de los problemas anteriores con la terapia con IL-12, se encuentran actualmente en ensayos clínicos para cánceres.

El receptor de IL-12 (IL-12R) es un complejo heterodimérico que consiste en cadenas de IL-12R β 1 e IL-12R β 2 expresadas en la superficie de células T activadas y células destructoras naturales. La cadena de IL-12R β 1 se une a la subunidad p40 de IL-12, mientras que p35 de IL-12 en asociación con IL-12R β 2 confiere una capacidad de señalización intracelular. La transducción de señales a través de IL-12R induce la fosforilación de la quinasa Janus (Jak2) y la tirosina quinasa (Tyk2), que fosforilan y activan el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)1, STAT3, STAT4 y STATS. Los efectos celulares específicos de IL-12 se deben principalmente a la activación de STAT4. La IL-12 induce a las células T y destructoras naturales a producir citocinas, en particular interferón (IFN) γ , que median muchas de las actividades proinflamatorias de la IL-12, incluida la diferenciación de las células T CD4 $^{+}$ hacia el fenotipo Th1.

En la presente se describen composiciones y métodos que comprenden IL-12 condicionalmente activa y otras citocinas diseñadas para abordar los riesgos asociados con la terapia con citocinas convencional y proporcionar terapias inmunomoduladoras muy necesarias.

La secuencia de aminoácidos para las subunidades p35 y p40 de IL-12 ilustrativas se proporcionan en la **Tabla 1a**.

Tabla 1a. Secuencias de aminoácidos de IL-12

Subunidad	Secuencia
mIL12 p35 WT	MWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDITWT SDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSH LLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTKFLKCEAPNYSGRFTCSW LVQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLD QRDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYEN YSTSFFIRDIIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWS TPHSYFSLKFFVRIQRKKEKMKETEEGCNQGAFLEKTS TEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSSCSKWACVPCRVR (sec. con núm. de ident.: 8056)
mIL12 p40 WT	RVIPVSGPARCLSQSRNLLKTDDMVKTAREKLKHYSCTA EDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTR GSCLPPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQN HNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEAD PYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSA (sec. con núm. de ident.: 8057)
hIL-12 p35 WT	RNLPVATPDPMFPCLLHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEF YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLN AS (sec. con núm. de ident.: 8050)
hIL-12 p40 WT	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGITWT LDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHS LLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTKFLRCEAKNYSGRF TCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAER

	VRGDNKEYEYSVEQCQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYP DTWSTPHSYFSLTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVI CRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS (sec. con núm. de ident.: 8051)
Variante hIL-12 p35 SSA	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEF YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYL SSA (sec. con núm. de ident.: 8052)
Variante hIL-12 p35 QAS (N195Q)	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEF YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYL QAS (sec. con núm. de ident.: 8053)
Variante hIL-12 p35 DAS (N195D)	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEF YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYL DAS (sec. con núm. de ident.: 8054)
Variante hIL-12 p35 XAS (N195X)	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKARQTLEF YPCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMN AKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSS LEEPDFYKTKIKLCILLHA FRIRAVTIDRVMSYL XAS , en

	donde X es cualquier residuo de aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 8055)
--	---

En algunas modalidades, la proteína de fusión descrita en la presente comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p35 silvestre, tal como la sec. con núm. de ident.: 8050 y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p40 silvestre, tal como la sec. con núm. de ident.: 8051.

En algunas modalidades, la proteína de fusión descrita en la presente comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p35 que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad con la sec. con núm. de ident.: 8050, y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p40 que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad con la sec. con núm. de ident.: 8051.

En algunas modalidades, la proteína de fusión descrita en la presente comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p35 silvestre, tal como la sec. con núm. de ident.: 8056 y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p40 silvestre, tal como la sec. con núm. de ident.: 8057.

En algunas modalidades, la proteína de fusión descrita en la presente comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p35 que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad con la sec. con núm. de ident.: 8056, y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p40 que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad, o 100 % de identidad con la sec. con núm. de ident.: 8057.

En algunas modalidades, la proteína de fusión descrita en la presente comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p35 de la variante mutante de aglicosilación. La secuencia de aminoácidos de la variante mutante de aglicosilación p35 comprende al menos una sustitución de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos NAS ubicada en el C-terminal de la secuencia de aminoácidos p35 silvestre. En algunas modalidades, la proteína de fusión descrita en la presente comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p35 de la variante mutante de aglicosilación que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad con cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 8052-8055. En algunas modalidades, la proteína de fusión descrita en la presente comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p35 de la variante mutante de aglicosilación de cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 8052-8055, y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos de p40 silvestre, tal como la sec. con núm. de ident.: 8051.

En algunas modalidades, el polipéptido de citocina en la proteína de fusión es Interleucina-2 (IL-2). La IL-2 ejerce funciones tanto estimulantes como reguladoras en el sistema inmune y es, junto con otros miembros de la familia de citocinas de cadena γ común, fundamental para la homeostasis inmunitaria. La IL-2 media su acción uniéndose a los receptores de IL-2 (IL-2R), que consisten en receptores triméricos formados por cadenas IL-2R α (CD25), IL-2R β (CD122) e IL-2R- γ (γ -c, CD132) o IL-2R β γ diméricos.

En algunas modalidades, el polipéptido de citocina en la proteína de fusión es Interleucina-15 (IL-15). La IL-15, un miembro de la familia de citocinas del grupo de las hélices 4-alfa, es un inmunomodulador para el tratamiento del cáncer. La IL-15 media su acción uniéndose a IL-15R α , que se expresa en células dendríticas presentadoras de antígeno, monocitos y macrófagos.

En algunas modalidades, el polipéptido de citocina en la proteína de fusión es Interleucina-7 (IL-7). La IL-7, también de la familia IL-2/IL-15, es expresada por células del estroma, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, células musculares lisas y queratinocitos, y después de su activación, por células dendríticas (Alpdogan et al., 2005).

5 Aunque la presente solicitud se ejemplifica usando IL-12 como la citocina ilustrativa, los expertos en la técnica entenderán que las enseñanzas proporcionadas en la presente se pueden adaptar fácilmente y describir y permitir el uso de proteínas de fusión formadas a partir de otras citocinas, fragmentos y muteínas, tales como IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 IL-23, IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gamma, TNF-alfa, linfotóxina, TGF-beta1, TGFbeta2, 10 TGFbeta3, GM-CSF, CXCL10, CCL19, CCL20, CCL21 y fragmentos funcionales o muteínas de cualquiera de los anteriores. Una descripción de las citocinas que se pueden incorporar a las proteínas de fusión descritas en la presente se proporcionan en WO2021262985A1, incorporado en la presente como referencia.

Varios elementos garantizan la administración y la actividad de la citocina en las proteínas 15 de fusión de la invención preferentemente en el sitio de actividad de citocina deseada y limitan severamente la exposición sistémica a la citocina a través de la unión a un ELNN descrito en la presente, lo que permite la extensión de la vida media sérica para la citocina de interés. En esta estrategia de extensión de la vida media sérica, la proteína de fusión puede circular durante tiempos prolongados (preferentemente 1-2 semanas o más) pero la 20 versión activada de la que se ha escindido la secuencia de ELNN tiene la vida media sérica típica de la citocina.

En comparación con una proteína de fusión, la vida media sérica de la citocina subyacente administrada por vía intravenosa es de solo unos 10 minutos debido a la distribución en todo el espacio extracelular del cuerpo. Posteriormente, la citocina se metaboliza por los 25 riñones con una vida media de 2,5 horas.

En algunas modalidades de esta invención, la proteína de fusión comprende un segmento de liberación que se escinde en el sitio de acción (p. ej., por proteasas específicas de la

inflamación o específicas del tumor), liberando de esta manera la actividad completa de la citocina en el sitio deseado y también separándola de la extensión de la vida media de la versión no escindida. En tales modalidades, la citocina completamente activa y libre tendría propiedades farmacocinéticas (pK, por sus siglas en inglés) muy diferentes: una vida media de horas en lugar de semanas. Además, la exposición a la citocina activa se limita al sitio de actividad de citocina deseada (p. ej., un sitio inflamatorio o el microambiente tumoral) y se reduce la exposición sistémica a la citocina activa y la toxicidad y los efectos secundarios asociados.

La creación de una proteína de fusión a partir de citocinas es un mecanismo elegante mediante el cual se puede mejorar el uso de las citocinas como agentes inmunoestimulantes, por ejemplo, para tratar el cáncer. Por ejemplo, en este aspecto, la farmacocinética y/o farmacodinámica de la citocina (p. ej., IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23, IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma, TNF-alfa, linfotóxina, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, GM-CSF, CXCL10, CCL19, CCL20, y CCL21 se pueden adaptar para activar al máximo las células efectoras (p. ej., células T de efecto, células NK) y/o células promotoras de la respuesta inmunitaria citotóxica (p. ej., inducir la maduración de células dendríticas) en un sitio de actividad deseada, tal como en un tumor o microambiente tumoral, pero preferentemente no sistémicamente.

Por lo tanto, se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de fusión que comprenden al menos un polipéptido de citocina, tales como interleucinas (p. ej., IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23), interferones (IFN, que incluye IFN-alfa, IFN-beta e IFN-gamma), factores de necrosis tumoral (p. ej., TNF-alfa, linfotóxina), factores de crecimiento transformante (p. ej., TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3), quimiocinas (p. ej., CXCL10, CCL19, CCL20, CCL21) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CS, por sus siglas en inglés) o un fragmento funcional o mutéina de cualquiera de los anteriores.

En algunas modalidades, los polipéptidos de citocina (incluidos los fragmentos funcionales) que se incluyen en las proteínas de fusión descritas en la presente no están mutados ni diseñados para alterar las propiedades de la citocina de origen natural, incluida la afinidad y especificidad de unión al receptor o la vida media sérica.

5

POLIPÉPTIDOS RECOMBINANTES EXTENDIDOS (ELNN)

Longitud de cadena y composición de aminoácidos

En algunas modalidades, un ELNN comprende al menos 100 o al menos 150 aminoácidos.

En algunas modalidades, un ELNN es de 100 a 3000, o de 150 a 3000 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un ELNN es de 100 a 1000, o de 150 a 1000 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un ELNN es al menos (aproximadamente) 100, al menos (aproximadamente) 150, al menos (aproximadamente) 200, al menos (aproximadamente) 250, al menos (aproximadamente) 300, al menos (aproximadamente) 350, al menos (aproximadamente) 400, al menos (aproximadamente) 450, al menos (aproximadamente) 500, al menos (aproximadamente) 550, al menos (aproximadamente) 600, al menos (aproximadamente) 650, al menos (aproximadamente) 700, al menos (aproximadamente) 750, al menos (aproximadamente) 800, al menos (aproximadamente) 850, al menos (aproximadamente) 900, al menos (aproximadamente) 950, al menos (aproximadamente) 1000, al menos (aproximadamente) 1100, al menos (aproximadamente) 1200, al menos (aproximadamente) 1300, al menos (aproximadamente) 1400, al menos (aproximadamente) 1500, al menos (aproximadamente) 1600, al menos (aproximadamente) 1700, al menos (aproximadamente) 1800, al menos (aproximadamente) 1900, o al menos (aproximadamente) 2000 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un ELNN es como máximo (aproximadamente) 100, como máximo (aproximadamente) 150, como máximo (aproximadamente) 200, como máximo (aproximadamente) 250, como máximo (aproximadamente) 300, como máximo (aproximadamente) 350, como máximo

(aproximadamente) 400, como máximo (aproximadamente) 450, como máximo (aproximadamente) 500, como máximo (aproximadamente) 550, como máximo (aproximadamente) 600, como máximo (aproximadamente) 650, a lo sumo la mayoría (alrededor de) 700, como máximo (aproximadamente) 750, como máximo

5 (aproximadamente) 800, como máximo (aproximadamente) 850, como máximo (aproximadamente) 900, como máximo (aproximadamente) 950, como máximo (aproximadamente) 1000, como máximo (aproximadamente) 1100, como máximo (aproximadamente) 1200, como máximo (aproximadamente) 1300, como máximo (aproximadamente) 1400, como máximo (aproximadamente) 1500, como máximo

10 (aproximadamente) 1600 como máximo (aproximadamente) 1700, como máximo (aproximadamente) 1800, como máximo (aproximadamente) 1900, o como máximo (aproximadamente) 2000 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un ELNN tiene (aproximadamente) 100, (aproximadamente) 150, (aproximadamente) 200, (aproximadamente) 250, (aproximadamente) 300, (aproximadamente) 350,

15 (aproximadamente) 400, (aproximadamente) 450, (aproximadamente) 500, (aproximadamente) 550, (aproximadamente) 600, (aproximadamente) 650, (aproximadamente) 700, (aproximadamente) 750, (aproximadamente) 800, (aproximadamente) 850, (aproximadamente) 900, (aproximadamente) 950, (aproximadamente) 1000, (aproximadamente) 1100, (aproximadamente) 1200,

20 (aproximadamente) 1300, (aproximadamente) 1400, (aproximadamente) 1500, (aproximadamente) 1600, (aproximadamente) 1700, (aproximadamente) 1800, (aproximadamente) 1900, o (aproximadamente) 2000 aminoácidos de longitud, o de un rango entre cualquiera de los dos anteriores. En algunas modalidades, al menos 90 % de los residuos de aminoácidos del ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T),

25 glutamato (E) o prolina (P). En algunas modalidades, al menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de los residuos de aminoácidos del ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P). En algunas

modalidades, un ELNN comprende al menos 3 tipos diferentes de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E y P. En algunas modalidades, un ELNN comprende al menos 4 tipos diferentes de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E y P. En algunas modalidades, un ELNN comprende al menos 5 tipos diferentes de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E y P. En algunas modalidades, un ELNN consiste en aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en G, A, S, T, E y P. En algunas modalidades, un ELNN comprende aminoácidos G, A, S, T, E, o P. En algunas modalidades, un ELNN (p. ej., ELNN1, ELNN2, etc.) se caracteriza porque: (i) comprende al menos 100, o al menos 150 aminoácidos; (ii) al menos 90 % de los residuos de aminoácidos del ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P); y (iii) comprende al menos 4 tipos diferentes de aminoácidos de G, A, S, T, E o P. Como se usa en la presente, el término “glutamato” es un sinónimo de “ácido glutámico” y se refiere al residuo de ácido glutámico independientemente de que el carboxilo de la cadena lateral esté desprotonado o no. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión que contiene ELNN comprende un primer ELNN y un segundo ELNN. En algunas modalidades, la suma del número total de aminoácidos en el primer ELNN y el número total de aminoácidos en el segundo ELNN es al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, o al menos 800 aminoácidos.

Motivo de secuencia no superpuesto

En algunas modalidades, el ELNN comprende, o se forma a partir de, una pluralidad de motivos de secuencia no superpuestos. En algunas modalidades, al menos uno de los motivos de secuencia no superpuestos es recurrente (o se repite al menos dos veces en el ELNN). En algunas modalidades, el ELNN comprende al menos otro motivo de secuencia no superpuesto que no es recurrente (o se encuentra solo una vez dentro del ELNN). En algunas modalidades, la pluralidad de motivos de secuencia no superpuestos comprende

(a) un conjunto de motivos de secuencia no superpuestos (recurrentes), en donde cada motivo de secuencia no superpuesto del conjunto de motivos de secuencia no superpuestos se repite al menos dos veces en el ELNN; y (b) un motivo de secuencia no superpuesto (no recurrente) que aparece (o se encuentra) solo una vez dentro del ELNN.

5 En algunas modalidades, cada motivo de secuencia no superpuesto tiene de 9 a 14 (o de 10 a 14, o de 11 a 13) aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, cada motivo de secuencia no superpuesto tiene 12 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, la pluralidad de motivos de secuencia no superpuestos comprende un conjunto de motivos de secuencia no superpuestos (recurrentes), en donde cada motivo de secuencia no superpuesto del conjunto de motivos de secuencia no superpuestos se repite (1) al menos
10 dos veces en el ELNN; y (2) tiene entre 9 y 14 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el conjunto de motivos de secuencia (recurrentes) no superpuestos comprende motivos de secuencia de 12 mer identificados en la presente por las sec. con núms. de ident.: 179-200 y 1715-1722 en la Tabla 1b. En algunas modalidades, el conjunto
15 de motivos de secuencia (recurrentes) no superpuestos comprende motivos de secuencia de 12 mer identificados en la presente por las sec. con núms. de ident.: y 186-189 en la Tabla 1b. En algunas modalidades, el conjunto de motivos de secuencia (recurrentes) no superpuestos comprende al menos dos, al menos tres o los cuatro motivos de secuencia de 12 mer de las sec. con núms. de ident.: 186-189 en la Tabla 1b. En algunas
20 modalidades, un ELNN comprende además una secuencia distinta a un motivo de secuencia de 12 mer que se muestra en la Tabla 1. En algunas modalidades, un ELNN comprende una secuencia que no está en la Tabla 1b, tal como ASSATPESGP (sec. con núm. de ident.:203), GSGPGTSESATP (sec. con núm. de ident.:201), o GTSESATP (sec. con núm. de ident.:204). En algunas modalidades, un ELNN comprende una secuencia que
25 no está en la Tabla 1b, tal como ATPESGP (sec. con núm. de ident.:205), GTSPSATPESGP (sec. con núm. de ident.:202), o GTSESAGEPEA (sec. con núm. de

ident.:206). En algunas modalidades, un ELNN comprende una secuencia de código de barras.

Tabla 1b. Motivos de secuencia de 12 mer ilustrativos para el constructo de ELNN

5

Familia de motivos*	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
AD	GESPGGSSGSES	182
AD	GSEGSSGPGESS	183
AD	GSSESGSSEGGP	184
AD	GSGGEPSESGSS	185
AE, AM	GSPAGSPTSTEE	186
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP	187
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP	188
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP	189
AF, AM	GSTSESPSGTAP	190
AF, AM	GTSTPESGSASP	191
AF, AM	GTSPSGESSTAP	192
AF, AM	GSTSSTAESPGP	193
AG, AM	GTPGSGTASSSP	194
AG, AM	GSSTPSGATGSP	195
AG, AM	GSSPSASTGTGP	196
AG, AM	GASPGTSSTGSP	197
AQ	GEPAGSPTSTSE	198
AQ	GTGEPSSTPASE	199
AQ	GSGPSTESAPTE	200
AQ	GSETPSGPSETA	179
AQ	GPSETSTSEPGA	180

Familia de motivos*	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
AQ	GSPSEPTEGTSA	181
BC	GSGASEPTSTEP	1715
BC	GSEPATSGTEPS	1716
BC	GTSEPSTSEPGA	1717
BC	GTSTEPSEPGSA	1718
BD	GSTAGSETSTE A	1719
BD	GSETATSGSETA	1720
BD	GTSESATSESGA	1721
BD	GTSTEASEGSAS	1722

*Denota secuencias de motivos individuales que, cuando se usan juntas en varias permutaciones, resultan en una “secuencia familiar”.

Confirmación de polipéptidos no estructurados

- 5 En diversas modalidades, un componente de ELNN (o los componentes de ELNN) de una proteína de fusión tiene una conformación no estructurada en condiciones fisiológicas, independientemente de la longitud (p. ej., longitud extendida) del polímero. Por ejemplo, el ELNN se caracteriza por una gran libertad conformacional de la estructura de péptidos. En algunas modalidades, el ELNN se caracteriza por una falta de interacciones de largo
- 10 alcance según lo determinado por RMN. En algunas modalidades, la presente descripción proporciona los ELNN que, en condiciones fisiológicas, se asemejan a la estructura de secuencias desnaturalizadas en gran medida desprovistos de estructura secundaria. En algunas modalidades, los ELNN pueden estar sustancialmente desprovistos de estructura secundaria en condiciones fisiológicas. “En gran parte desprovisto”, como se usa en este
- 15 contexto, significa que menos de 50 % de los residuos de aminoácidos del ELNN contribuyen a la estructura secundaria según lo medido o determinado por los medios descritos en la presente. “Sustancialmente desprovisto”, como se usa en este contexto, significa que al menos aproximadamente 60 %, o aproximadamente 70 %, o

aproximadamente 80 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 %, o al menos aproximadamente 99 % de los residuos de aminoácidos de ELNN de la secuencia de ELNN no contribuyen a la estructura secundaria, según lo medido o determinado por los medios descritos en la presente.

5 Se han establecido diversos métodos en la técnica para discernir la presencia o ausencia de estructuras secundarias y terciarias en un polipéptido dado. En algunas modalidades, la estructura secundaria de ELNN se puede medir espectrofotométricamente, p. ej., mediante espectroscopia de dicroísmo circular en la región espectral de “UV lejano” (190-250 nm). Los elementos de estructura secundaria, tales como la hélice alfa y la lámina beta,
10 dan lugar cada uno a una forma y magnitud características de los espectros de CD. La estructura secundaria también se puede predecir para una secuencia de polipéptidos a través de ciertos programas informáticos o algoritmos, tales como el conocido algoritmo Chou-Fasman (Chou, P. Y., *et al.* (1974) *Biochemistry*, 13: 222-45) y el algoritmo Garnier-Osguthorpe-Robson (“GOR”) (Garnier J, Gibrat JF, Robson B. (1996), método GOR para
15 predecir la estructura secundaria de la proteína a partir de la secuencia de aminoácidos. Métodos Enzymol 266:540-553), como se describe en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. núm. 20030228309A1 (cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia). Para una secuencia dada, los algoritmos pueden predecir si existe alguna estructura secundaria o no existe, expresada como el total y/o porcentaje de
20 residuos de la secuencia que forman, por ejemplo, hélices alfa o láminas beta, o el porcentaje de residuos de la secuencia que se predice que resultarán en la formación de una espiral aleatoria (que carece de estructura secundaria).

En algunas modalidades, los ELNN usados en una composición de proteína de fusión pueden tener un porcentaje de hélice alfa que varía de 0 % a menos de aproximadamente
25 5 %, según lo determinado por un algoritmo de Chou-Fasman. En algunas modalidades, los ELNN de las composiciones de proteínas de fusión pueden tener un porcentaje de lámina beta que varía de 0 % a menos de aproximadamente 5 %, según lo determinado

por un algoritmo de Chou-Fasman. En algunas modalidades, los ELNN de las composiciones de proteína de fusión pueden tener un porcentaje de hélice alfa que varía de 0 % a menos de aproximadamente 5 % y un porcentaje de lámina beta que varía de 0 % a menos de aproximadamente 5 %, según lo determinado por un algoritmo de Chou-Fasman. En algunas modalidades, los ELNN de las composiciones de proteína de fusión tendrán un porcentaje de hélice alfa menor que aproximadamente 2 % y un porcentaje de lámina beta menor que aproximadamente 2 %. En algunas modalidades, los ELNN de las composiciones de proteínas de fusión pueden tener un alto grado de porcentaje de bobina aleatoria, según lo determinado por un algoritmo GOR. En algunas modalidades, un ELNN puede tener al menos aproximadamente 80 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 90 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 91 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 92 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 93 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 94 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 95 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 96 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 97 %, con mayor preferencia al menos aproximadamente 98 %, y con la máxima preferencia al menos aproximadamente 99 % de bobina aleatoria, según lo determinado por un algoritmo GOR.

Carga neta

En algunas modalidades, los polipéptidos de ELNN pueden tener una característica no estructurada impartida por la incorporación de residuos de aminoácidos con una carga neta y/o reduciendo la proporción de aminoácidos hidrófobos en la secuencia de ELNN. La carga neta general y la densidad de carga neta se pueden controlar, p. ej., modificando el contenido de aminoácidos cargados en los ELNN. En algunas modalidades, la densidad de carga neta del ELNN de las composiciones puede ser superior a +0,1 o inferior a -0,1 cargas/residuo. En algunas modalidades, la carga neta de un ELNN puede ser de aproximadamente 0 %, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente

3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 11 %, aproximadamente 12 %, aproximadamente 13 %, aproximadamente 14 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 16 %, aproximadamente 17 %, aproximadamente 18 %, aproximadamente 19 %, o aproximadamente 20 % o más.

Dado que la mayoría de los tejidos y superficies de un ser humano o un animal tienen una carga neta negativa, los ELNN se pueden diseñar opcionalmente para tener una carga neta negativa para minimizar las interacciones no específicas entre las composiciones que contienen ELNN y varias superficies tales como vasos sanguíneos, tejidos sanos o varios receptores. Sin limitarse a una teoría en particular, un ELNN puede adoptar conformaciones abiertas debido a la repulsión electrostática entre aminoácidos individuales del polipéptido de ELNN que individualmente llevan una alta carga neta negativa y que se distribuyen a lo largo de la secuencia del polipéptido de ELNN. Tal una distribución de carga negativa neta en las longitudes de secuencia extendidas de ELNN puede conducir a una conformación no estructurada que, a su vez, puede resultar en un aumento efectivo del radio hidrodinámico. En consecuencia, en algunas modalidades, los ELNN contienen ácido glutámico de tal manera que el ácido glutámico representa aproximadamente 8, 10, 15, 20, 25, o incluso aproximadamente 30 % de los aminoácidos en las secuencias. El ELNN de las composiciones de la presente descripción generalmente no tienen o tienen un contenido bajo de aminoácidos cargados positivamente. En algunas modalidades, el ELNN puede tener menos de aproximadamente 10 % de residuos de aminoácidos con una carga positiva, o menos de aproximadamente 7 %, o menos de aproximadamente 5 %, o menos de aproximadamente 2 % de residuos de aminoácidos con una carga positiva. Sin embargo, la presente descripción contempla polipéptidos en los que un número limitado de aminoácidos con una carga positiva, tal como la lisina, se pueden incorporar en un ELNN, p. ej., para permitir la conjugación entre la amina épsilon de la lisina y un grupo reactivo en

un péptido, un puente conector o un grupo reactivo en un fármaco o molécula pequeña que se va a conjugar con la cadena principal del ELNN.

En algunas modalidades, un ELNN puede comprender residuos cargados separados por otros residuos tales como serina o glicina, lo que puede conducir a un mejor comportamiento de expresión o purificación. Basado en la carga neta, los ELNN de las composiciones en cuestión pueden tener un punto isoeléctrico (pI) de 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 o incluso 6,5. En algunas modalidades, el ELNN tendrá un punto isoeléctrico entre 1,5 y 4,5. En algunas modalidades, un ELNN incorporado en una proteína de fusión lleva una carga negativa neta en condiciones fisiológicas que contribuye a la conformación no estructurada y a la unión reducida del componente ELNN a proteínas y tejidos de mamíferos.

Como los aminoácidos hidrófobos pueden impartir estructura a un polipéptido, en algunas modalidades el contenido de aminoácidos hidrófobos en el ELNN es menos de 5 %, o menos de 2 %, o menos de 1 % del contenido de aminoácidos hidrófobos. En algunas modalidades, un ELNN no tiene aminoácidos hidrófobos. En algunas modalidades, el contenido de aminoácidos de metionina y triptófano en el componente ELNN de una proteína de fusión es menor que 5 %, o menor que 2 %, y con la máxima preferencia menor que 1 %. En algunas modalidades, el ELNN tiene una secuencia que tiene menos de 10 % de residuos de aminoácidos con una carga positiva, o menos de aproximadamente 7 %, o menos de aproximadamente 5 %, o menos de aproximadamente 2 % de residuos de aminoácidos con una carga positiva, la suma de residuos de metionina y triptófano será menor que 2 %, y la suma de residuos de asparagina y glutamina será menor que 10 % de la secuencia total del ELNN. En algunas modalidades, el ELNN no tiene residuos de metionina o triptófano.

Radio hidrodinámico aumentado

En algunas modalidades, el ELNN puede tener un radio hidrodinámico alto, lo que confiere un peso molecular aparente aumentado correspondiente a la proteína de fusión que incorpora el ELNN. La unión de los ELNN a secuencias de citocinas puede resultar en composiciones de proteínas de fusión que pueden tener radios hidrodinámicos aumentados, un peso molecular aparente aumentado y un factor de peso molecular aparente aumentado en comparación con las citocinas no unidas a un ELNN. Por ejemplo, en algunas aplicaciones terapéuticas en las que se desea una vida media prolongada, uno o más ELNN con un radio hidrodinámico alto se incorporan a una proteína de fusión que comprende una citocina para ampliar efectivamente el radio hidrodinámico de la proteína de fusión más allá del tamaño del poro glomerular de aproximadamente 3-5 nm (que corresponde a un peso molecular aparente de aproximadamente 70 kDa) (Caliceti. 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. Adv. Drug Deliv. Rev. 55:1261-1277), que resulta en una reducción del aclaramiento renal de las proteínas circulantes. En algunas modalidades, el radio hidrodinámico de una proteína se determina por su peso molecular así como por su estructura, incluida la forma y la compacidad. Sin limitarse a una teoría particular, el ELNN puede adoptar conformaciones abiertas debido a la repulsión electrostática entre cargas individuales del péptido o la flexibilidad inherente impartida por los aminoácidos particulares en la secuencia que carecen de potencial para conferir estructura secundaria. En algunas modalidades, la conformación abierta, extendida y no estructurada del polipéptido ELNN tiene un radio hidrodinámico proporcional mayor en comparación con los polipéptidos de una longitud de secuencia y/o peso molecular comparable que tienen estructura secundaria y/o terciaria, tales como las proteínas globulares típicas. Los métodos para determinar el radio hidrodinámico son bien conocidos en la técnica, tales como mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés), como se describe en las patentes de los EE. UU. núms. 6.406.632 y 7.294.513. En algunas modalidades, la

adición de longitudes crecientes de ELNN resulta en aumentos proporcionales en los parámetros de radio hidrodinámico, peso molecular aparente y factor de peso molecular aparente, lo que permite adaptar la fusión a los pesos moleculares aparentes de corte característicos deseados o radios hidrodinámicos. En consecuencia, en algunas modalidades, la proteína de fusión se puede configurar con un ELNN de tal manera que la proteína de fusión pueda tener un radio hidrodinámico de al menos aproximadamente 5 nm, o al menos aproximadamente 8 nm, o al menos aproximadamente 10 nm, o 12 nm, o al menos aproximadamente 15 nm. En algunas modalidades, el gran radio hidrodinámico conferido por el ELNN en una proteína de fusión puede conducir a una reducción de la depuración renal de la proteína de fusión resultante, lo que conduce a un aumento correspondiente en la vida media terminal, un aumento en el tiempo de residencia medio y/o una disminución en la tasa de depuración renal.

En algunas modalidades, un ELNN (o múltiples ELNN, tales como dos ELNN) de una longitud y secuencia elegidas se pueden incorporar selectivamente en una citocina para crear una proteína de fusión que tendrá, en condiciones fisiológicas, un peso molecular aparente de al menos aproximadamente 150 kDa, o al menos aproximadamente 300 kDa, o al menos aproximadamente 400 kDa, o al menos aproximadamente 500 kDa, o al menos aproximadamente 600 kDa, o al menos aproximadamente 700 kDa, o al menos aproximadamente 800 kDa, o al menos aproximadamente 900 kDa, o al menos aproximadamente 1000 kDa, o al menos aproximadamente 1200 kDa, o al menos aproximadamente 1500 kDa, o al menos aproximadamente 1800 kDa, o al menos aproximadamente 2000 kDa, o al menos aproximadamente 2300 kDa o más. En algunas modalidades, un ELNN (o múltiples ELNN, tales como dos ELNN) de una longitud y secuencia elegidas se puede unir selectivamente a una citocina para resultar en una proteína de fusión que tiene, en condiciones fisiológicas, un factor de peso molecular aparente de al menos 3, alternativamente de al menos 4, alternativamente de al menos 5, alternativamente de al menos 6, alternativamente de al menos 7, alternativamente de al

menos 8, alternativamente de al menos 9, alternativamente de al menos 10, alternativamente de al menos 15, o un factor de peso molecular aparente de al menos 20 o más. En algunas modalidades, la proteína de fusión tiene, en condiciones fisiológicas, un factor de peso molecular aparente que es de aproximadamente 4 a aproximadamente 20, o de aproximadamente 6 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 8 a aproximadamente 12, o de aproximadamente 9 a aproximadamente 10 en relación con el peso molecular real de la proteína de fusión. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión exhibe un factor de peso molecular aparente en condiciones fisiológicas que es mayor que aproximadamente 6.

Vida media terminal aumentada

En algunas modalidades, un polipéptido de fusión que comprende un ELNN tiene una vida media terminal que es al menos dos veces más larga, o al menos tres veces más larga, o al menos cuatro veces más larga, o al menos cinco veces más larga, en comparación con un polipéptido biológicamente activo correspondiente que no se vincula al ELNN. En algunas modalidades, el polipéptido (de fusión) tiene una vida media terminal que es al menos dos veces más larga en comparación con el polipéptido biológicamente activo no unido al ELNN.

En algunas modalidades, la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión a un sujeto que la necesita resulta en una ganancia en el tiempo de al menos el doble, o al menos el triple, o al menos el cuádruple, o al menos el quíntuple o más transcurrido dentro de una ventana terapéutica para la proteína de fusión en comparación con la citocina correspondiente no vinculada a los ELNN cuando se administra en una dosis comparable a un sujeto.

En algunas modalidades, una citocina liberada de una proteína de fusión tras la escisión por proteasa comprende uno o más polipéptidos cortos (p. ej., aproximadamente 30, 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10 o menos aminoácidos de longitud) que no tiene otros aminoácidos

que G, A, P, E, S y/o T. Por ejemplo, un polipéptido corto que no tiene otros aminoácidos que G, A, P, E, S y/o T se podría incorporar en una o más secuencias espaciadoras o enlazadoras de la citocina, y/o una parte de uno o más espaciadores o enlazadores que siguen siendo parte de la citocina después de la escisión. En algunas modalidades, una
5 citocina que se libera de una proteína de fusión comprende un GTSESATPES (sec. con núm. de ident.: 96) en el lado N-terminal (p. ej., el aminoácido más cercano de la secuencia está dentro de las posiciones de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos del aminoácido N-terminal o la secuencia incluye el N-terminal) de la citocina. En algunas modalidades, una citocina que se libera de una proteína de fusión comprende un GTATPESGPG en el
10 lado C-terminal (p. ej., el aminoácido más cercano de la secuencia está dentro de las posiciones de aminoácidos 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 del aminoácido N-terminal o la secuencia incluye el N-terminal) de la citocina.

Inmunogenicidad baja

15 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona composiciones en las que los ELNN tienen un bajo grado de inmunogenicidad o son sustancialmente no inmunogénicos. Varios factores pueden contribuir a la baja inmunogenicidad de un ELNN, p. ej., la secuencia sustancialmente no repetitiva, la conformación no estructurada, el alto grado de solubilidad, el bajo grado o falta de autoagregación, el bajo grado o falta de sitios
20 proteolíticos dentro de la secuencia y el bajo grado o falta de epítomos en el ELNN.

Un experto en la técnica entenderá que, en general, los polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos cortas altamente repetitivas (p. ej., en donde una secuencia de 200 aminoácidos de longitud contiene en promedio 20 repeticiones o más de un conjunto limitado de 3 o 4 mer) y/o que tienen residuos de aminoácidos repetitivos contiguos (p. ej.,
25 en donde las secuencias de 5 o 6 mer tienen residuos de aminoácidos idénticos) tienen una tendencia a agregarse o formar estructuras de orden superior o formar contactos que resultan en estructuras cristalinas o pseudocristalinas.

En algunas modalidades, una secuencia de ELNN es sustancialmente no repetitiva, en donde (1) la secuencia de ELNN no tiene tres aminoácidos contiguos que sean tipos de aminoácidos idénticos, a menos que el aminoácido sea serina, en cuyo caso no más de tres aminoácidos contiguos pueden ser residuos de serina; y en donde (2) el ELNN no
5 contiene secuencias de 3 aminoácidos (3-mer) que aparezcan más de 16, más de 14, más de 12 o más de 10 veces dentro de una secuencia de al menos 200 aminoácidos de longitud del ELNN (p. ej., la extensión completa de un ELNN que tiene al menos aminoácidos de longitud). Sin limitarse a ninguna teoría científica, estas secuencias sustancialmente no repetitivas tienen menos tendencia a agregarse y, por lo tanto, permiten
10 el diseño de ELNN de secuencia larga con una frecuencia relativamente baja de aminoácidos cargados que probablemente se agregarían si las secuencias o los residuos de aminoácidos fueran más repetitivos.

Los epítomos conformacionales pueden formarse por regiones de superficies proteicas que están compuestas por múltiples secuencias discontinuas de aminoácidos de un antígeno
15 proteico. Sin estar sujeto a ninguna teoría científica, el plegamiento preciso de la proteína puede llevar estas secuencias a configuraciones espaciales estables bien definidas o epítomos que pueden reconocerse como “extraños” por el sistema inmune humoral del huésped, que dan como resultado la producción de anticuerpos contra la proteína y/o desencadena una respuesta inmune mediada por células. En este último caso, la respuesta
20 inmune a una proteína en un individuo está fuertemente influenciada por el reconocimiento de epítomos de células T que es una función de la especificidad de unión de péptidos del alotipo HLA-DR de ese individuo. El compromiso de un complejo peptídico MHC Clase II por un receptor de células T cognado en la superficie de la célula T, junto con la unión cruzada de ciertos otros correceptores como la molécula CD4, puede inducir un estado
25 activado dentro de la célula T. La activación puede conducir a la liberación de citocinas que activan aún más otros linfocitos como las células B para producir anticuerpos o que activan las células T asesinas como una respuesta inmune celular completa.

Sin estar limitado por ninguna teoría científica, la capacidad de un péptido para unirse a una molécula dada de MHC clase II para su presentación en la superficie de una APC (célula presentadora de antígeno) puede depender de una serie de factores; sobre todo su secuencia primaria. En algunas modalidades, se puede lograr un menor grado de inmunogenicidad diseñando ELNN que resistan el procesamiento de antígenos en células presentadoras de antígeno, y/o eligiendo secuencias que no se unan bien a los receptores del MHC. En algunas modalidades, las proteínas de fusión que contienen ELNN tienen polipéptidos de ELNN sustancialmente no repetitivos diseñados para reducir la unión con receptores MHC II, así como para evitar la formación de epítomos para el receptor de células T o la unión de anticuerpos, que da como resultado un bajo grado de inmunogenicidad. Sin estar sujeto a ninguna teoría científica, evitar la inmunogenicidad es, en parte, un resultado directo de la flexibilidad conformacional de los ELNN; es decir, la falta de estructura secundaria debido a la selección y orden de los residuos de aminoácidos. Por ejemplo, de particular interés son las secuencias que tienen una baja tendencia a adaptar conformaciones plegadas de forma compacta en solución acuosa o en condiciones fisiológicas que podrían dar como resultado epítomos conformacionales. La administración de proteínas de fusión que comprenden ELNN, que usan prácticas terapéuticas convencionales y dosificación, generalmente no darían como resultado la formación de anticuerpos neutralizantes contra los ELNN, y también puede reducir la inmunogenicidad de las parejas de fusión de citocinas en las composiciones de proteínas de fusión.

En algunas modalidades, los ELNN utilizados en las proteínas de fusión sujeto pueden estar sustancialmente libres de epítomos reconocidos por las células T humanas. La eliminación de tales epítomos con el propósito de generar menos proteínas inmunogénicas se ha divulgado previamente; ver, por ejemplo, los WO 98/52976, WO 02/079232, y WO 00/3317 que se incorporan en la presente como referencia. Se han descrito ensayos para epítomos de células T humanas (Stickler, M., *et al.* (2003) *J Immunol Methods*, 281: 95-

108). De particular interés son las secuencias peptídicas que pueden oligomerizarse sin generar epítomos de células T o secuencias no humanas. Esto se puede lograr al probar repeticiones directas de estas secuencias para la presencia de epítomos de células T y para la ocurrencia de secuencias de 6 a 15 mer y, en particular, de 9 mer que no son humanas, y después alterar el diseño de la secuencia ELNN para eliminar o interrumpir la secuencia de epítomos. En algunas modalidades, los ELNN son sustancialmente no inmunogénicos por la restricción del número de epítomos del ELNN predicho para unirse a los receptores del MHC. Con una reducción en el número de epítomos capaces de unirse a los receptores del MHC, existe una reducción concomitante en el potencial de activación de las células T así como de la función auxiliar de las células T, una activación reducida de las células B o una regulación al alza y una producción reducida de anticuerpos. El bajo grado de epítomos de células T predichos puede determinarse mediante algoritmos de predicción de epítomos tales como, p. ej., TEPITOPE (Sturniolo, T., *et al.* (1999) *Nat Biotechnol*, 17: 555-61), como se muestra en el Ejemplo 74 de la publicación de solicitud de patente internacional núm. WO 2010/144502 A2, que se incorpora por referencia en su totalidad. Aspectos de la puntuación TEPITOPE de un marco peptídico dado dentro de una proteína se describen en Sturniolo, T. *et al.* (1999) *Nature Biotechnology* 17:555). La puntuación oscila sobre al menos 20 logs, de aproximadamente 10 a aproximadamente -10 (correspondiente a restricciones de unión de $0e^{10} K_D$ a $10e^{-10} K_D$), y puede reducirse evitando aminoácidos hidrófobos que pueden servir como residuos de anclaje durante la presentación de péptidos en el MHC, como M, I, L, V o F. En algunas modalidades, un componente de ELNN incorporado en una proteína de fusión no tiene un epítomo de células T predicho en una puntuación TEPITOPE de aproximadamente -5 o mayor, o -6 o mayor, o -7 o mayor, o -8 o mayor, o en una puntuación TEPITOPE de -9 o mayor. Como se usa en la presente, una puntuación de “-9 o mayor” abarcaría puntuaciones TEPITOPE de 10 a -9, inclusive, pero no abarcaría una puntuación de -10, ya que -10 es menor que -9.

En algunas modalidades, los ELNN, que incluye los incorporados en las proteínas de fusión sujeto, pueden hacerse sustancialmente no inmunogénicas mediante la restricción de sitios proteolíticos conocidos de la secuencia del ELNN, que reduce el procesamiento de ELNN en péptidos pequeños que pueden unirse a los receptores del MHC II. En algunas modalidades, la secuencia de ELNN puede hacerse sustancialmente no inmunogénica mediante el uso de una secuencia que está sustancialmente desprovista de estructura secundaria, confiriendo resistencia a muchas proteasas debido a la alta entropía de la estructura. Por consiguiente, la puntuación TEPITOPE reducida y la eliminación de sitios proteolíticos conocidos del ELNN pueden hacer que las composiciones de ELNN, que incluye el ELNN de las composiciones de proteínas de fusión, sean sustancialmente incapaces de unirse por receptores de mamíferos, que incluye los del sistema inmune. En algunas modalidades, un ELNN de una proteína de fusión puede tener una unión de $K_D > 100$ nM a un receptor de mamífero, o más de 500 nM K_D , o mayor que 1 μ M K_D hacia una superficie celular de mamífero o receptor polipeptídico circulante. Adicionalmente, la secuencia sustancialmente no repetitiva y la correspondiente falta de epítomos de tales modalidades de ELNN pueden limitar la capacidad de las células B para unirse a o ser activadas por los ELNN. En algunas modalidades, mientras que un ELNN puede hacer contactos con muchas células B diferentes a través de su secuencia extendida, cada célula B individual solo puede hacer uno o un pequeño número de contactos con un ELNN individual. Como resultado, los ELNN típicamente pueden tener una tendencia mucho menor a estimular la proliferación de células B y, por lo tanto, una respuesta inmune. En algunas modalidades, la proteína de fusión puede tener inmunogenicidad reducida en comparación con la citocina correspondiente que no está fusionada a un polipéptido de máscara tal como un ELNN. En algunas modalidades, la administración de hasta tres dosis parenterales de una proteína de fusión a un mamífero puede dar como resultado proteína anti-fusión de IgG detectable a una dilución sérica de 1:100 pero no a una dilución de 1:1000. En algunas modalidades, la administración de

hasta tres dosis parenterales de una proteína de fusión a un mamífero puede dar como resultado IgG anticitocina detectable a una dilución sérica de 1:100 pero no a una dilución de 1:1000. En algunas modalidades, la administración de hasta tres dosis parenterales de proteína de fusión a un mamífero puede dar como resultado IgG anti-ELNN detectable a una dilución sérica de 1:100 pero no a una dilución de 1:1000. En algunas modalidades, el mamífero puede ser, p. ej., un ratón, una rata, un conejo, un mono cynomolgus o un ser humano. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano.

Una característica adicional de ciertos ELNN con secuencias sustancialmente no repetitivas en relación con aquellas secuencias menos no repetitivas (tal como una que tiene tres aminoácidos contiguos que son idénticos) puede ser que los ELNN no repetitivos formen contactos más débiles con citocinas (p. ej., interacciones monovalentes), lo que resulta en una menor probabilidad de aclaramiento inmune de tal manera que las composiciones de proteína de fusión puedan permanecer en circulación durante un período de tiempo aumentado.

En algunas modalidades, un polipéptido biológicamente activo (tal como una citocina) que comprende un ELNN es menos inmunogénico en comparación con el polipéptido de fusión no unido a ningún ELNN, en donde la inmunogenicidad se determina midiendo la producción de anticuerpos IgG que se unen selectivamente al polipéptido biológicamente activo después de la administración de dosis comparables a un sujeto.

Fragmento de código de barras

En algunas modalidades, un polipéptido (p. ej., un polipéptido de fusión o una porción de este tal como un ELNN) comprende uno o más fragmentos de código de barras (p. ej., un primer, segundo o tercer fragmento de código de barras) liberables del polipéptido después de la digestión por una proteasa. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa no mamífera. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa procariótica. Como se usa en la presente, el término “fragmento de código de barras” (o “código de barras”, o

“secuencia de código de barras”) puede referirse a la porción del polipéptido fusionada de manera escindible dentro del polipéptido, o al fragmento peptídico resultante liberado del polipéptido.

En algunas modalidades, un fragmento de código de barras (1) es una porción de un ELNN que incluye al menos parte del motivo de secuencia (no recurrente, no solapante) que ocurre (o se encuentra) solo una vez dentro del ELNN; y (2) difiere en secuencia y peso molecular de todos los demás fragmentos peptídicos que son liberables del polipéptido después de la escisión o digestión completa del polipéptido por la proteasa.

En algunas modalidades, un fragmento de código de barras no incluye el aminoácido N-terminal o el aminoácido C-terminal del polipéptido de fusión. Como se describe en la presente, en algunas modalidades, un fragmento de código de barras es liberable (p. ej., se configura para liberarse) después de la digestión con Glu-C del polipéptido de fusión.

En algunas modalidades, un fragmento de código de barras está en un ELNN y no incluye un ácido glutámico que esté inmediatamente adyacente a otro ácido glutámico, si está

presente, en el ELNN. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene un ácido glutámico en su C-terminal. Un experto la técnica entenderá que el C-terminal de un fragmento de código de barras puede referirse al “último” (o el más C-terminal) residuo de aminoácido dentro del fragmento de código de barras, cuando se fusiona de manera

escindible dentro de un polipéptido (tal como un ELNN), incluso si otros residuos de aminoácidos que no son de código de barras se posicionan de manera C-terminal con respecto al fragmento de código de barras dentro del polipéptido (p. ej., ELNN). En algunas

modalidades, un fragmento de código de barras tiene un aminoácido N-terminal que está inmediatamente precedido por un residuo de ácido glutámico. En algunas modalidades, el residuo de ácido glutámico que precede al aminoácido N-terminal no es inmediatamente

adyacente a otro residuo de ácido glutámico. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras no incluye un (segundo) residuo de ácido glutámico en una posición distinta del C-terminal del fragmento de código de barras a menos que el ácido glutámico

sea seguido inmediatamente por una prolina. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se posiciona a una distancia del N-terminal del polipéptido o del C-terminal del polipéptido, en donde la distancia es de 10 a 150, o de 10 a 125 aminoácidos. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se posiciona dentro de, o en una
5 ubicación de, 300, 280, 260, 250, 240, 220, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 48, 40, 36, 30, 24, 20, 12, o 10 aminoácidos del N-terminal del polipéptido, o en una ubicación en un rango entre cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se posiciona dentro de 200, dentro de 150, dentro de 100, o dentro de 50 aminoácidos del N-terminal del polipéptido. En algunas
10 modalidades, un fragmento de código de barras se posiciona en una ubicación que está entre 10 y 200, entre 30 y 200, entre 40 y 150, o entre 50 y 100 aminoácidos del N-terminal del polipéptido. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se posiciona dentro, o en una ubicación de, 300, 280, 260, 250, 240, 220, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 48, 40, 36, 30, 24, 20, 12, o 10 aminoácidos
15 del C-terminal del polipéptido, o en una ubicación en una ubicación en un rango entre cualquiera de los anteriores. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se posiciona dentro de 200, dentro de 150, dentro de 100, o dentro de 50 aminoácidos del C-terminal del polipéptido. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras se posiciona en una ubicación que está entre 10 y 200, entre 30 y 200, entre 40 y 150, o entre
20 50 y 100 aminoácidos del C-terminal del polipéptido. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras (BAR) se caracteriza porque: (i) no incluye un ácido glutámico que esté inmediatamente adyacente a otro ácido glutámico, si está presente, en el ELNN; (ii) tiene un ácido glutámico en su C-terminal; (iii) tiene un aminoácido N-terminal que está inmediatamente precedido por un residuo de ácido glutámico; y (iv) se posiciona
25 a una distancia de ya sea el N-terminal del polipéptido o del C-terminal del polipéptido, en donde la distancia es de 10 a 150 aminoácidos, o de 10 a 125 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras está en un ELNN y (i) no incluye

el aminoácido N-terminal o el aminoácido C-terminal del polipéptido; (ii) no incluye un ácido glutámico que esté inmediatamente adyacente a otro ácido glutámico en el ELNN; (iii) tiene un ácido glutámico en su C-terminal; (iv) tiene un aminoácido N-terminal que está inmediatamente precedido por un residuo de ácido glutámico; y (v) se posiciona a una distancia del ya sea el N-terminal del polipéptido o del C-terminal del polipéptido, en donde la distancia es de 10 a 150, o de 10 a 125 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el residuo de ácido glutámico que precede al aminoácido N-terminal no es inmediatamente adyacente a otro residuo de ácido glutámico. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras no incluye un residuo de ácido glutámico en una posición distinta del C-terminal del fragmento de código de barras a menos que el ácido glutámico sea seguido inmediatamente por una prolina. Dependiendo del contexto en la presente y cuando se refiere a la colocación dentro de una secuencia polipeptídica, el término “distancia” puede referirse al número de residuos de aminoácidos desde el N-terminal del polipéptido hasta el residuo de aminoácido más N-terminal del fragmento de código de barras, o desde el C-terminal del polipéptido hasta el residuo de aminoácido más C-terminal del fragmento de código de barras. En algunas modalidades, para un ELNN con código de barras fusionado a un polipéptido biológicamente activo, al menos un fragmento de código de barras (o al menos dos fragmentos de código de barras, o tres fragmentos de código de barras) contenido en el ELNN con código de barras se posiciona al menos 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 aminoácidos del polipéptido biológicamente activo. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, o al menos 8 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene al menos 4 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 aminoácidos de longitud, o en un rango entre cualquiera de los valores anteriores. En algunas modalidades, un fragmento de código de barras tiene entre 4 y 20, entre 5 y 15, entre 6 y 12, o entre 7 y 10 aminoácidos de longitud.

En algunas modalidades, un fragmento de código de barras comprende una secuencia de aminoácidos identificada en la presente mediante las sec. con núms. de ident.: 68-79 y las sec. con núms. de ident.: 1010-1029 en la Tabla 2.

5 Tabla 2. Fragmentos de código de barras ilustrativos liberables después de digestión en Glu-C

Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
SPATSGSTPE	68
GSAPATSE	69
GSAPGTATE	70
GSAPGTE	71
PATSGPTE	72
SASPE	73
PATSGSTE	74
GSAPGTSAE	75
SATSGSE	76
SGPGSTPAE	77
SGPGSGPGTSE	78
SGPGTSPSATPE	79
SGPGTGTSATPE	1010
SGPGTTPGTTPE	1011
SGPGTPPTSTPE	1012
SGPGTGSAGTPE	1013
SGPGTGGAGTPE	1014
SGPGTSPGATPE	1015
SGPGTSGSGTPE	1016

Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
SGPGTSSASTPE	1017
SGPGTGAGTTPE	1018
SGPGTGSTSTPE	1019
TPGSEPATSGSE	1020
GSAPGTSTEPSE	1021
SGPGTAGSGTPE	1022
SGPGTSSGGTPE	1023
SGPGTAGPATPE	1024
SGPGTPGTGTPE	1025
SGPGTGGPTTPE	1026
SGPGTGSGSTPE	1027
SGPGSGPATSE	1028
SGPGTSASATPE	1029

En algunas modalidades, cada fragmento de código de barras difiere tanto en secuencia como en peso molecular de todos los demás fragmentos peptídicos liberables de los polipéptidos quiméricos descritos en la presente después de la digestión completa del polipéptido quimérico por una proteasa no mamífera. En algunas modalidades, la proteasa no mamífera es Glu-C.

En algunas modalidades, los polipéptidos quiméricos descritos en la presente comprenden un sitio de escisión de Glu-C que comprende una de las siguientes secuencias de aminoácidos: ATPESGPG (sec. con núm. de ident.: 2223), SGSETPGT (sec. con núm. de ident.: 2242), y GTSESATP (sec. con núm. de ident.: 204).

En algunas modalidades, los polipéptidos quiméricos descritos en la presente comprenden al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: PE.GSX_nPE.SG (sec. con núm. de ident.: 2243), PE.GSX_nSE.GG (sec. con núm. de ident.: 2244), PE.GSX_nSE.TG

(sec. con núm. de ident.: 2246), PE.GSX_nSE.SA (sec. con núm. de ident.: 2245), PE.SGX_nPE.SG (sec. con núm. de ident.: 2247), PE.SGX_nSE.GG (sec. con núm. de ident.: 2248), PE.SGX_nSE.TG (sec. con núm. de ident.: 2250), PE.SGX_nSE.SA (sec. con núm. de ident.: 2249), y PE.TPX_nPE.SG (sec. con núm. de ident.: 2251), PE.TPX_nSE.GG (sec. con núm. de ident.: 2252), PE.TPX_nSE.TG (sec. con núm. de ident.: 2254), PE.TPX_nSE.SA (sec. con núm. de ident.: 2253), en donde cada “.” es un sitio de escisión de Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50. En algunas modalidades, los polipéptidos quiméricos descritos en la presente comprenden al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos: PE.SGX_nPE.SG (sec. con núm. de ident.: 2247), PE.GSX_nSE.GG (sec. con núm. de ident.: 2244), PE.TPX_nSE.TG (sec. con núm. de ident.: 2254), PE.SGX_nSE.SA (sec. con núm. de ident.: 2249). En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 1 a 20. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 10. En algunas modalidades, n es 9. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, X_n es SGPGTGTSATPE (sec. con núm. de ident.: 1010), SGPGSGPGTSE (sec. con núm. de ident.: 78), SGPGTTPGTTPE (sec. con núm. de ident.: 1011), SGPGTPPTSTPE (sec. con núm. de ident.: 1012), SGPGTSPSATPE (sec. con núm. de ident.: 79), SGPGTGSAAGTPE (sec. con núm. de ident.: 1013), SGPGTGGAGTPE (sec. con núm. de ident.: 1014), SGPGTSPGATPE (sec. con núm. de ident.: 1015), SGPGTSGSGTPE (sec. con núm. de ident.: 1016), SGPGTSSASTPE (sec. con núm. de ident.: 1017), SGPGTGAGTTPE (sec. con núm. de ident.: 1018), SGPGTGSTSTPE (sec. con núm. de ident.: 1019), TPGSEPATSGSE (sec. con núm. de ident.: 1020), GSAPGTSTEPSE (sec. con núm. de ident.: 1021), SGPGTAGSGTPE (sec. con núm. de ident.: 1022), SGPGTSSGGTPE (sec. con núm. de ident.: 1023), SGPGTAGPATPE (sec. con núm. de ident.: 1024), SGPGTPGTGTPE (sec. con núm. de ident.: 1025), SGPGTGGPTTPE (sec. con núm. de ident.: 1026), o SGPGTGSGSTPE (sec. con núm. de ident.: 1027).

En algunas modalidades, un polipéptido quimérico comprende al menos una de las siguientes secuencias de aminoácidos:

SGPE.SGPGX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2001), SGPE.SGPGX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2002), SGPE.SGPGX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2003), SGPE.SGPGX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2004), SGPE.SGPGX_nSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2005), SGPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2006), SGPE.SGPGX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2007), SGPE.SGPGX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2007), SGPE.SGPGX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2008), SGPE.SGPGX_nGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.:2009), SGPE.SGPGX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2010), ATPE.SGPGX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2011), ATPE.SGPGX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2012), ATPE.SGPGX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2013), ATPE.SGPGX_nATSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2014), ATPE.SGPGX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2015), ATPE.SGPGX_nSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2016), ATPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2017), ATPE.SGPGX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2018), ATPE.SGPGX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2019), ATPE.SGPGX_nGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.:2020), ATPE.SGPGX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2021), GTSE.SATPX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2022), GTSE.SATPX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2023), GTSE.SATPX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2024), GTSE.SATPX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2025), GTSE.SATPX_nSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2026), GTSE.SATPX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2027), GTSE.SATPX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2028), GTSE.SATPX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2029), GTSE.SATPX_nGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.:2030), GTSE.SATPX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2031), TTPE.SGPGX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2032), TTPE.SGPGX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2033), TTPE.SGPGX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2034),

TTPE.SGPGX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2035), TTPE.SGPGX_nSTPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2036), TTPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de
 ident.:2037), TTPE.SGPGX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2038),
 TTPE.SGPGX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2039), TTPE.SGPGX_nGTPE.GSAP
 5 (sec. con núm. de ident.:2040), TTPE.SGPGX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2041),
 STPE.SGPGX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2042), STPE.SGPGX_nATPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2043), STPE.SGPGX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2044),
 STPE.SGPGX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2045), STPE.SGPGX_nSTPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2046), STPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de
 10 ident.:2047), STPE.SGPGX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2048),
 STPE.SGPGX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2049), STPE.SGPGX_nGTPE.GSAP
 (sec. con núm. de ident.:2050), STPE.SGPGX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2051),
 GTPE.SGPGX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2052), GTPE.SGPGX_nATPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2053), GTPE.SGPGX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de
 15 ident.:2054), GTPE.SGPGX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2055),
 GTPE.SGPGX_nSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2056), GTPE.SGPGX_nGTPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2057), GTPE.SGPGX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de
 ident.:2058), GTPE.SGPGX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2059),
 GTPE.SGPGX_nGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.:2060), GTPE.SGPGX_nEPSE.SATP
 20 (sec. con núm. de ident.:2061), GTPE.TPGSX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de
 ident.:2062), GTPE.TPGSX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2063),
 GTPE.TPGSX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2064), GTPE.TPGSX_nTTPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2065), GTPE.TPGSX_nSTPE.SGPG (sec. con núm. de
 ident.:2066), GTPE.TPGSX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2067),
 25 GTPE.TPGSX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2068), GTPE.TPGSX_nSGSE.TGTP
 (sec. con núm. de ident.:2069), GTPE.TPGSX_nGTPE.GSAP (sec. con núm. de
 ident.:2070), GTPE.TPGSX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2071),

SGSE.TGTPX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2072), SGSE.TGTPX_nATPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2073), SGSE.TGTPX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2074),
 SGSE.TGTPX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2075), SGSE.TGTPX_nSTPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2076), SGSE.TGTPX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de
 5 ident.:2077), SGSE.TGTPX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2078),
 SGSE.TGTPX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2079), SGSE.TGTPX_nGTPE.GSAP
 (sec. con núm. de ident.:2080), SGSE.TGTPX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2081),
 GTPE.GSAPX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2082), GTPE.GSAPX_nATPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2083), GTPE.GSAPX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2084),
 10 GTPE.GSAPX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2085), GTPE.GSAPX_nSTPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2086), GTPE.GSAPX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de
 ident.:2087), GTPE.GSAPX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2088),
 GTPE.GSAPX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2089), GTPE.GSAPX_nGTPE.GSAP
 (sec. con núm. de ident.:2090), GTPE.GSAPX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2091),
 15 EPSE.SATPX_nSGPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2092), EPSE.SATPX_nATPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2093), EPSE.SATPX_nGTSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2094),
 EPSE.SATPX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2095), EPSE.SATPX_nSTPE.SGPG
 (sec. con núm. de ident.:2096), EPSE.SATPX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2097),
 EPSE.SATPX_nGTPE.TPGS (sec. con núm. de ident.:2098), EPSE.SATPX_nSGSE.TGTP
 20 (sec. con núm. de ident.:2099), EPSE.SATPX_nGTPE.GSAP (sec. con núm. de ident.:2100),
 o EPSE.SATPX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2101), en donde cada “.” es un sitio
 de escisión de Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 50. En algunas modalidades,
 el polipéptido quimérico comprende al menos una de las siguientes secuencias de
 aminoácidos:
 25 SGPE.SGPGX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2105), ATPE.SGPGX_nGTSE.SATP
 (sec. con núm. de ident.:2103), ATPE.SGPGX_nATSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2104),
 ATPE.SGPGX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2106), ATPE.SGPGX_nSTPE.SGPG

(sec. con núm. de ident.:2107), ATPE.SGPGX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2102), ATPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2108), ATPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2108), ATPE.SGPGX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2102), GTPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2109), GTPE.SGPGX_nSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2110), GTPE.SGPGX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2111), GTPE.SGPGX_nSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2110), GTPE.TPGSX_nSGSE.TGTP (sec. con núm. de ident.:2112), GTPE.GSAPX_nEPSE.SATP (sec. con núm. de ident.:2113), ATPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2108), ATPE.SGPGX_nATPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2102), ATPE.SGPGX_nGTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2108), TTPE.SGPGX_nTTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2114), o STPE.SGPGX_nSTPE.SGPG (sec. con núm. de ident.:2115), en donde cada “.” es un sitio de escisión de Glu-C y n es cualquier número entero de 0 a 30. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 1 a 20. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 3 a 7. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 10. En algunas modalidades, n es 9. En algunas modalidades, n es 4. En algunas modalidades, n es 3. En algunas modalidades, n es cualquier número entero de 5 a 15. En algunas modalidades, en donde X_n es PGTGTSAT (sec. con núm. de ident.: 2233), PGSGPGT (sec. con núm. de ident.: 2221), PGTTPGTT (sec. con núm. de ident.: 2241), PGTPPTST (sec. con núm. de ident.: 2235), PGTSPSAT (sec. con núm. de ident.: 2238), PGTGSAGT (sec. con núm. de ident.: 2230), PGTGGAGT (sec. con núm. de ident.: 2228), PGTSPGAT (sec. con núm. de ident.: 2237), PGTS GSGT (sec. con núm. de ident.: 2236), PGTSSAST (sec. con núm. de ident.: 2239), PGTGAGTT (sec. con núm. de ident.: 2227), PGTGSTST (sec. con núm. de ident.: 2232), GSEPATSG (sec. con núm. de ident.: 2224), APGTSTEP (sec. con núm. de ident.: 2222), PGTAGSGT (sec. con núm. de ident.: 2226), PGTSSGGT (sec. con núm. de ident.: 2240), PGTAGPAT (sec. con núm. de ident.: 2225),

PGTPGTGT (sec. con núm. de ident.: 2234), PGTGGPTT (sec. con núm. de ident.: 2229), o PGTGSGST (sec. con núm. de ident.: 2231). En algunas modalidades, X_n es TSAS (sec. con núm. de ident.: 2214), TGTS (sec. con núm. de ident.: 2211), SGP, TTPG (sec. con núm. de ident.: 2220), TPPT (sec. con núm. de ident.: 2213), TSPS (sec. con núm. de ident.: 2217), TGSA (sec. con núm. de ident.: 2208), TGGA (sec. con núm. de ident.: 2206), TSPG (sec. con núm. de ident.: 2216), TSGS (sec. con núm. de ident.: 2215), TSSA (sec. con núm. de ident.: 2218), TGAG (sec. con núm. de ident.: 2205), TGST (sec. con núm. de ident.: 2210), EPAT (sec. con núm. de ident.: 2201), GTST (sec. con núm. de ident.: 2202), TAGS (sec. con núm. de ident.: 2204), TSSG (sec. con núm. de ident.: 2219), TAGP (sec. con núm. de ident.: 2203), TPGT (sec. con núm. de ident.: 2212), TGGP (sec. con núm. de ident.: 2207), o TGSG (sec. con núm. de ident.: 2209).

En algunas modalidades, los códigos de barras se diseñan para tener propiedades analíticas mejoradas. En algunas modalidades, tales códigos de barras pueden liberarse con concentraciones relativamente modestas de una proteasa no mamífera tal como Glu-C. Esto facilita una mejor detección, p. ej., a través de LC/MS, y también permite la medición de péptidos que se generan a partir del enlazador escindible, lo que permite una medición de productos de escisión usando, p. ej., LC/MS.

En algunas modalidades de proteínas de fusión que comprenden un ELNN, la proteína de fusión tiene una única cadena polipeptídica, y la cadena polipeptídica comprende un fragmento de código de barras que está en una posición dentro de la cadena polipeptídica que es de 10 a 200 aminoácidos o de 10 a 125 aminoácidos del N-terminal o del C-terminal de la cadena de polipéptidos. En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende un primer ELNN y un segundo ELNN, el primer ELNN está en el lado N-terminal de la citocina, y el primer fragmento de código de barras se posiciona dentro de 200, 150, 100 o 50 aminoácidos del N-terminal de la proteína de fusión. En algunas modalidades, el segundo ELNN está en el lado C-terminal de la citocina, y el segundo fragmento de código

de barras se posiciona dentro de 200, 150, 100 o 50 aminoácidos del C-terminal del polipéptido quimérico.

En algunas modalidades, un ELNN comprende además uno o más fragmentos de código de barras adicionales, en donde el uno o más fragmentos de código de barras adicionales difieren cada uno en secuencia y peso molecular de todos los demás fragmentos de péptidos que son liberables del polipéptido después de la digestión completa del polipéptido por la proteasa. En algunas modalidades, un ELNN con código de barras comprende solo un fragmento de código de barras. En algunas modalidades, un ELNN con código de barras comprende un conjunto de fragmentos de código de barras, que comprende un primer fragmento de código de barras, tal como los descritos en la presente. En algunas modalidades, el conjunto de fragmentos de código de barras comprende un segundo fragmento de código de barras (o un fragmento de código de barras adicional), tal como los descritos en la presente. En algunas modalidades, el conjunto de fragmentos de código de barras comprende un tercer fragmento de código de barras, tal como los descritos en la presente.

Un conjunto de fragmentos de código de barras fusionados dentro de un ELNN N-terminal puede denominarse un conjunto de N-terminal de códigos de barras (un “conjunto de N-terminal”). Un conjunto de fragmentos de código de barras fusionados dentro de un ELNN C-terminal puede denominarse un conjunto de códigos de barras de C-terminal (un “conjunto de C-terminal”). En algunas modalidades, el conjunto de N-terminal comprende un primer fragmento de código de barras y un segundo fragmento de código de barras. En algunas modalidades, el conjunto de N-terminal comprende además un tercer fragmento de código de barras. En algunas modalidades, el conjunto de C-terminal comprende un primer fragmento de código de barras y un segundo fragmento de código de barras. En algunas modalidades, el conjunto de C-terminal comprende además un tercer fragmento de código de barras. En algunas modalidades, el polipéptido comprende un conjunto de fragmentos de código de barras que incluye un primer fragmento de código de barras, un

(segundo) fragmento de código de barras adicional, y al menos un fragmento de código de barras adicional, en donde cada fragmento de código de barras del conjunto de fragmentos de código de barras (1) es una porción del segundo ELNN y (2) difiere en secuencia y peso molecular de todos los demás fragmentos de péptidos que son liberables del polipéptido después de la digestión completa del polipéptido por la proteasa.

En la presente se incluye una mezcla que comprende una pluralidad de polipéptidos de longitud variable; la mezcla comprende un primer conjunto de polipéptidos y un segundo conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos comprende un fragmento de código de barras que (a) es liberable del polipéptido por digestión con una proteasa y (b) tiene una secuencia y peso molecular que difiere de la secuencia y peso molecular de todos los demás fragmentos que son liberables del primer conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, el segundo conjunto de polipéptidos carece del fragmento de código de barras del primer conjunto de polipéptidos (p. ej., debido al truncamiento). En algunas modalidades, tanto el primer conjunto de polipéptidos como el segundo conjunto de polipéptidos comprenden cada uno un fragmento de referencia que (a) es común al primer conjunto de polipéptidos y al segundo conjunto de polipéptidos y (b) liberable por digestión con la proteasa. En algunas modalidades, la relación del primer conjunto de polipéptidos a polipéptidos que comprenden el fragmento de referencia es mayor que 0,70. En algunas modalidades, la relación del primer conjunto de polipéptidos a polipéptidos que comprenden el fragmento de referencia es mayor que 0,80, 0,90, 0,95 o 0,98. En algunas modalidades, el fragmento de referencia se produce no más de una vez en cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa que se escinde en el lado C-terminal de los residuos de ácido glutámico. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa Glu-C. En algunas modalidades, la proteasa no es tripsina. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitudes variables comprenden polipéptidos que comprenden al menos un ELNN, tal como cualquiera descrito en la presente. En

algunas modalidades, el primer conjunto de polipéptidos comprende un polipéptido de longitud completa, en donde el fragmento de código de barras es una porción del polipéptido de longitud completa. En algunas modalidades, el polipéptido de longitud completa es un polipéptido (fusión), tal como cualquiera descrito anteriormente en la presente o descrito en cualquier otro lugar en la presente. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitudes variables en una mezcla difieren entre sí debido al truncamiento de N-terminal, al truncamiento de C-terminal o al truncamiento tanto de N-terminal como de C-terminal de un polipéptido de longitud completa. En algunas modalidades, el primer conjunto de polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos pueden diferir en una o más propiedades farmacológicas.

La presente descripción también proporciona métodos para evaluar, en una mezcla que comprende polipéptidos de longitud variable, una cantidad relativa de un primer conjunto de polipéptidos en la mezcla a un segundo conjunto de polipéptidos en la mezcla, en donde (1) cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos comparte un fragmento de código de barras que se produce una vez y solo una vez en el polipéptido y (2) cada polipéptido del segundo conjunto de polipéptidos carece del fragmento de código de barras que es compartido por polipéptidos del primer conjunto, en donde polipéptidos individuales tanto del primero de los polipéptidos como el segundo conjunto de polipéptidos comprende cada uno un fragmento de referencia. En algunas modalidades, los métodos comprenden poner en contacto la mezcla con una proteasa para producir una pluralidad de fragmentos proteolíticos que resultan de la escisión del primer conjunto de polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos, en donde la pluralidad de fragmentos proteolíticos comprende una pluralidad de fragmentos de referencia, y una pluralidad de fragmentos de código de barras. En algunas modalidades, los métodos pueden comprender además determinar una relación entre la cantidad de fragmentos de código de barras y la cantidad de fragmentos de referencia, de esta manera se evalúan las cantidades relativas del primer conjunto de polipéptidos con respecto al segundo conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades,

el fragmento de código de barras se produce no más de una vez en cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, el fragmento de referencia se produce no más de una vez en cada polipéptido del primer conjunto de polipéptidos y el segundo conjunto de polipéptidos. En algunas modalidades, la pluralidad de fragmentos proteolíticos comprende una pluralidad de fragmentos de referencia, y una pluralidad de fragmentos de código de barras. En algunas modalidades, la proteasa escinde los conjuntos primero y segundo de polipéptidos (o los polipéptidos de longitud variable) en el lado C-terminal de los residuos de ácido glutámico que no están seguidos por un residuo de prolina. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa Glu-C. En algunas modalidades, la proteasa no es tripsina. En algunas modalidades, la etapa de determinar una relación entre la cantidad de fragmentos de código de barras y la cantidad de fragmentos de referencia comprende identificar fragmentos de código de barras y fragmentos de referencia de la mezcla después de que se haya puesto en contacto con la proteasa. En algunas modalidades, los fragmentos de código de barras y los fragmentos de referencia se identifican basado en sus respectivas masas. En algunas modalidades, los fragmentos de código de barras y los fragmentos de referencia se identifican mediante espectrometría de masas.

En algunas modalidades, los fragmentos de código de barras y los fragmentos de referencia se identifican mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS, por sus siglas en inglés). En algunas modalidades, la etapa de determinar una relación de los fragmentos de código de barras con respecto a los fragmentos de referencia comprende el etiquetado isobárico. En algunas modalidades, la etapa de determinar una relación de los fragmentos de código de barras con respecto a los fragmentos de referencia comprende el aumento de la mezcla con uno o ambos de un fragmento de referencia etiquetado con isótopos y un fragmento de código de barras etiquetado con isótopos. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitudes variables comprenden polipéptidos que comprenden al menos un ELNN, como se describió anteriormente en la presente o

descrito en cualquier otro lugar en la presente. En algunas modalidades, el ELNN se caracteriza porque (i) comprende al menos 100, o al menos 150 aminoácidos; (ii) al menos 90 % de los residuos de aminoácidos del ELNN son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P); y (iii) comprende al menos 4 tipos diferentes de aminoácidos que son G, A, S, T, E, o P. En algunas modalidades, el fragmento de código de barras, cuando está presente, es una porción del ELNN. En algunas modalidades, la mezcla de polipéptidos de longitudes variables comprende un polipéptido como cualquiera descrito anteriormente en la presente o descrito en cualquier otro lugar en la presente. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitud variable comprenden un polipéptido de longitud completa y fragmentos truncados de este. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitud variable consisten esencialmente en el polipéptido de longitud completa y fragmentos truncados de este. En algunas modalidades, los polipéptidos de longitudes variables en una mezcla difieren entre sí debido al truncamiento de N-terminal, al truncamiento de C-terminal o al truncamiento tanto de N-terminal como de C-terminal de un polipéptido de longitud completa. En algunas modalidades, el polipéptido de longitud completa es un polipéptido como se describió anteriormente en la presente o descrito en cualquier otro lugar en la presente. En algunas modalidades, la relación entre la cantidad de fragmentos de código de barras y fragmentos de referencia es mayor que 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90, 0,95, 0,98 o 0,99.

Cuantificación de péptidos basada en etiquetado isobárico

En algunas modalidades, el etiquetado isobárico puede usarse para determinar una relación de los fragmentos de código de barras con respecto a los fragmentos de referencia. El etiquetado isobárico es una estrategia de espectrometría de masas usada en proteómica cuantitativa, en donde los péptidos o proteínas (o porciones de estos) se etiquetan con diversos grupos químicos que son isobáricos (idénticos en masa) pero varían en términos de distribución de isótopos pesados alrededor de su estructura. En algunas modalidades,

estas etiquetas, comúnmente denominadas etiquetas de masa en tándem, se diseñada de manera que la etiqueta de masa se escinda en una región enlazadora específica después de la disociación inducida por colisión (CID, por sus siglas en inglés) de alta energía durante la espectrometría de masas en tándem, produciendo de esta manera iones informadores de diferentes masas. Algunas de las etiquetas isobáricas más comunes son las etiquetas reactivas con amina.

Polipéptidos de ELNN con código de barras ilustrativos

En la presente se incluyen ELNN que comprenden fragmentos de código de barras que son porciones de los ELNN.

Secuencias de aminoácidos de ELNN con código de barras ejemplares, que contienen un código de barras (p. ej., sec. con núm. de ident.: 8002-8003, 8005-8009 y 8013-8022), o dos códigos de barras (p. ej., sec. con núm. de ident.: 8001, 8004 y 8012), o tres códigos de barras (p. ej., sec. con núm. de ident.: 8011), se ilustran en la Tabla 3a. En algunas modalidades, entre estos ELNN con código de barras ejemplares, 12 (sec. con núm. de ident.: 8001-8003, 8008-8009, 8011, 8015-8019 y 8022) deben fusionarse con una proteína biológicamente activa (tal como una citocina) en el C-terminal de la proteína biológicamente activa, y 10 (sec. con núm. de ident.: 8004-8007, 8010, 8012-8014, 8020 y 8021) deben fusionarse en el N-terminal de la proteína biológicamente activa. En algunas modalidades, el ELNN tiene al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia identificada en la presente mediante la sec. con núm. de ident.: 8001-8022 en la Tabla 3a.

Tabla 3a. ELNN con código de barras ilustrativo

Sec. con núm. de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
8001	C-terminal de ELNN	2	PGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGT	864

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGftabTSESATPESGPGSE <u>PATSGPTE</u> SGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE <u>GSAPGTE</u> STPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGEPEA	
8002	C-terminal de ELNN	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT	864

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			STEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATP	

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSE <u>PATSG</u> <u>PTESG</u> SEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGEPEA	
8003	C-terminal de ELNN	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	864

Sec. con núm. de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE <u>GSAPGTE</u> STPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGEPEA	
8004	N-terminal de ELNN	2	ASSPAGSPTSTESGTSESATPE SGPGTETEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES	288

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			ATPES <u>SGPGSTPAE</u> SGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGE <u>SPATSGSTPE</u> GTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGGSAP	
8005	N-terminal de ELNN	1	ASSPAGSPTSTESGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGE <u>SPATSGSTPE</u> GTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGGSAP	288

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
8006	N-terminal de ELNN	1	ASSPAGSPTSTESGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPE <u>SGPGSTPAE</u> SGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEEPATSGSTPEGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGGSAP	288
8007	N-terminal de ELNN	1	ASSPAGSPTSTESGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPE <u>SGPGSTPAE</u> SGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTST	288

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGGSAP	
8008	C-terminal de ELNN	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTST	864

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSA PG TSESATPESGPGSE P ATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSE PATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSESATPESGP GSE PATSGSETPGSE PATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE <u>GSAPGTE</u> STPSEGSAPGSE PAT SGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPG	
8009	C-terminal de ELNN	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSE PATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSE PATSGSETPGTSESAT PESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS	576

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			ESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP EGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSE <u>GSA</u> <u>PGTE</u> STPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPG	
8010	N-terminal de ELNN	2	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPE <u>SG</u> <u>PGSTPAE</u> SGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG	1152

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			TPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTESAS	
8011	C-terminal de ELNN	3	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS	1152

Sec. con núm. de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATP	

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			ESGPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGSE <u>PATSGSTE</u> TPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSE <u>GSAPGT</u> <u>ATE</u> SPEGSAPGTSESATPESGP GTSTEPSE <u>GSAPGTSAE</u> SATPE SGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTESAS	
8012	N-terminal de ELNN	2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSE <u>GSAPATSE</u> SATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSE <u>SASPE</u> SG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG	864

Sec. con núm. de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE	

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			PSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAP	
8013	N-terminal de ELNN	1	GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSE <u>SATSGSET</u> PGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS	864

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			TEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAP	
8014	N-terminal de ELNN	1	SPAGSPTSTESGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESAT PE <u>SGPGSTPAESGSET</u> PGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP	292

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			AGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGGSAP	
8015	C-terminal de ELNN	1	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG	582

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			TSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSE<u>GSA</u> <u>PGTE</u>STPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGEPEA	
8016	C-terminal de ELNN	1	TPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGS	576

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			ETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGSE <u>SATSGSE</u> TPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESA	
8017	C-terminal de ELNN	1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSG GSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE	576

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSE <u>SASPE</u> SGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGP	
8018	C-terminal de ELNN	1	GSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP	576

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSE <u>PATSGSTE</u> TGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATS	
8019	C-terminal de ELNN	1	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES	576

Sec. con núm. de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			ATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEP EGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSE <u>SASPE</u> SGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESAT	
8020	N-terminal de ELNN	1	ASSPAGSPTSTESGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPE <u>SGPGSTPA</u> ESGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSET	294

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGGSAP	
8021	N-terminal de ELNN	1	ASSATPESGPGTSTEPSEGS A PGTSESATPE <u>SGPGSGPGTSE</u> SATPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGS A PGSEPATSGSETPGTSESATP	294
8022	C-terminal de ELNN	1	ATPESGPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGS A PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSET	582

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			PGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGTSESATP <u>ESGPGTSPSATPESGPGSEPA</u> TSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGTSESAGEPEA	
8023	N-terminal de ELNN	1	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TP <u>SGPGSGPATSE</u> SATPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS	287

Sec. con núm. de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			ESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSES AT	
8024	N-terminal de ELNN	1	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPES <u>SGPGSGPATSE</u> SATPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATP	288
8025	C-terminal de ELNN	1	ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGTSTE	288

Sec. con núm. de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESAT PE <u>SGPGTSPSATPE</u> SGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAG	
8026	N-terminal de ELNN	1	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TP <u>SGPGSGPGTSE</u> SATPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSES AT	287
8027	N-terminal de ELNN	1	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TP <u>SGPGSGPGTSE</u> SATPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAP	288

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATP	
8028	C-terminal de ELNN	1	ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPES <u>SG</u> <u>PGTSASATPE</u> SGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGE PEA	288
8029	N-terminal de ELNN		GSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP	288

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPE SGP	
8030	C-terminal de ELNN		GTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGS AP	288

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
8031	N-terminal de ELNN		ASSATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSGPGTSES ATPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSESATP	210
8032	C-terminal de ELNN		ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSAS ATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATGEPEA	210
8033	N-terminal de ELNN		ASSATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSGPATSESA TPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGT	210

Sec. con número de ident.:	Tipo de ELNN	Núm(s). de código(s) de barra(s)	Secuencia de aminoácidos	Núm. total de AA
			SESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATP	
8034	C-terminal de ELNN		APGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGPSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPG T	148
8035	C-terminal de ELNN		ATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGP GTSPSATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSET	210

En algunas modalidades, se puede obtener un ELNN con código de barras haciendo una o más mutaciones al ELNN existente, tal como cualquiera enumerado en la Tabla 3b, de acuerdo con uno o más de los siguientes criterios: minimizar el cambio de secuencia en el

ELNN, minimizar el cambio de composición de aminoácidos en el ELNN, mantener sustancialmente la carga neta del ELNN, mantener sustancialmente (o mejorar) la baja inmunogenicidad del ELNN N, y mantener sustancialmente (o mejorar) las propiedades farmacocinéticas del ELNN. En algunas modalidades, la secuencia ELNN tiene al menos 5 90 %, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las sec. con núms. de ident.: 601-659 enumeradas en la Tabla 3b. En algunas modalidades, la secuencia ELNN, que tiene al menos 90 % (p. ej., al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 %) pero menor que 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 601-659 10 enumeradas en la Tabla 3b, se obtiene mediante una o más mutaciones (p. ej., menor que 10, menor que 8, menor que 6, menor que 5, menor que 4, menor que 3, menor que 2 mutaciones) de la secuencia correspondiente de la Tabla 3b. En algunas modalidades, la una o más mutaciones comprenden delección de un residuo de ácido glutámico, inserción de un residuo de ácido glutámico, sustitución de un residuo de ácido glutámico, o 15 sustitución por un residuo de ácido glutámico, o cualquier combinación de estos. En algunas modalidades, donde la secuencia ELNN difiere de, pero tiene al menos 90 % (p. ej., al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 %) de identidad de secuencia con, una cualquiera de las sec. con núm. de ident.: 601-659 enumeradas en la Tabla 3b, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 %, o 20 aproximadamente 100 % de la diferencia entre la secuencia de ELNN y la secuencia correspondiente de la Tabla 3b implican la eliminación de un residuo de ácido glutámico, inserción de un residuo de ácido glutámico, sustitución de un residuo de ácido glutámico o sustitución por un residuo de ácido glutámico, o cualquier combinación de estos. En algunas de tales modalidades, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 25 97 %, o aproximadamente 100 % de la diferencia entre la secuencia ELNN y la secuencia correspondiente de la Tabla 3b implican una sustitución de un residuo de ácido glutámico, o una sustitución por un residuo de ácido glutámico, o ambos.

La “una sustitución de un primer aminoácido”, como se usa en la presente, se refiere a la sustitución del primer residuo de aminoácido por un segundo residuo de aminoácido, que da como resultado que el segundo residuo de aminoácido tome su lugar en la posición de sustitución en la secuencia obtenida. Por ejemplo, “una sustitución de ácido glutámico” se refiere a la sustitución del residuo de ácido glutámico (E) por un residuo de ácido no glutámico (p. ej., serina (S)).

Tabla 3b. ELNN existentes ilustrativos para el diseño en el (los) ELNN con código de barras

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAP	601
AE144_1A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APG	602
AE144_2A	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPG	603

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
AE144_2B	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPG	604
AE144_3A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPG	605
AE144_3B	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPG	606
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPG	607
AE144_4B	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPG	608

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
AE144_5A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEG	609
AE144_6B	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPG	610
AE288_1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAP	611
AE288_2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG	612

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE	615

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAP	
AE865	GGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES	616

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAP	
AE866	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS	617

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG	
AE1152	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE	618

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	
AE144A	STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGS	619
AE144B	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPG	620

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
AE180A	TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATS	621
AE216A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESAT	622
AE252A	ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSE	623
AE288A	TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS	624

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESA	
AE324A	PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATS	625
AE360A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESAT	626

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
AE396A	PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPS	627
AE432A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATS	628
AE468A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT	629

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGTSESAT	
AE504A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG	630

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPS	
AE540A	TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEP	631
AE576A	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEE	632

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT GSETPGTSESA	
AE612A	GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT	633

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGTSESAT	
AE648A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESAT	634
AE684A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE	635

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPAT	
AE720A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS	636

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTE	
AE756A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS	637

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSA PGTSSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSES	
AE792A	EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP	638

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPS	
AE828A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA	639

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESAT	
AE869	GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST	640

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGR	
AE144_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTES ASR	641
AE288_R1	SAGSPTGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPSASR	642
AE432_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS	643

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTESASR	
AE576_R1	SAGSPTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPSASR	644
AE864_R1	SAGSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT	645

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTESASR	
AE712	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE	646

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEAAAA	
AE864_R2	GSPGAGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT	647

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTESASR	
AE288_3	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPG	648
AE284	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT	649

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SE	
AE292	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGGSAP	650
AE864_2	AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP	651

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	SEGSA PGTS ESATPESGPGSE PATSGSETPGTSES ATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTS ESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSE TPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGA AEPEA	
AE867	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSE PATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPG	652

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGA AEPEA	
AE867_2	SPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES	653

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPG	
AE868	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST	654

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGAAEPEA	
AE144_7A	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAP	655
AE292	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGGSAP	656
AE293	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG	657

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPEGAAEPEA	
AE300	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGAAEPEA	658
AE584	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS	659

Nombre de ELNN	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGAAEPEA	

En algunas modalidades, para construir la secuencia de un ELNN con código de barras, se realizan mutaciones de aminoácidos en ELNN de longitudes intermedias a las de la Tabla 3b, así como ELNN de longitudes más largas que las de la Tabla 3b, tales como aquellas en las que uno o más motivos de 12 mer de la Tabla 1b se añaden al N- o C-terminal de un ELNN de propósito general de la Tabla 3b.

Ejemplos adicionales de ELNN existentes que pueden usarse de acuerdo con la presente descripción se describen en las publicaciones de patentes de los EE. UU. núms. 2010/0239554, 2010/0323956, 2011/0046060, 2011/0046061, 2011/0077199, o 2011/0172146, o publicaciones de patentes internacionales núms. WO 2010091122, WO 2010144502, WO 2010144508, WO 2011028228, WO 2011028229, WO 2011028344, WO 2014/011819, WO 2015/023891, WO 2017/040344, WO 2019/126576, WO 2020/264200; WO 2020/264208; WO 2021/097186, WO 2021/262985, o WO 2021/263058.

En algunas modalidades, un ELNN con código de barras fusionado dentro de una cadena polipeptídica adyacente al N-terminal de la cadena polipeptídica ("ELNN N-terminal") se puede unir a una etiqueta His de HHHHHH (sec. con núm. de ident.: 48) o HHHHHHHH (sec. con núm. de ident.: 49) en el N-terminal para facilitar la purificación del polipéptido de fusión. En algunas modalidades, un ELNN con código de barras fusionado dentro de una

cadena polipeptídica en el C-terminal de la cadena polipeptídica (“ELNN de C-terminal”) puede comprenderse o unirse a la secuencia EPEA en el C-terminal para facilitar la purificación del polipéptido de fusión. En algunas modalidades, el polipéptido de fusión comprende tanto un ELNN con código de barras N-terminal como un ELNN con código de barras C-terminal, en donde el ELNN con código de barras N-terminal está unido a una etiqueta His de HHHHHH (sec. con núm. de ident.: 48) o HHHHHHHH (sec. con núm. de ident.: 49) en el N-terminal; y en donde el ELNN con código de barras C-terminal se une a la secuencia EPEA en el C-terminal, de esta manera facilita la purificación del polipéptido de fusión, por ejemplo, hasta al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o al menos 99 % de pureza mediante métodos de cromatografía conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía IMAC, matriz de afinidad C-tagXL, y otros métodos de este tipo.

Un fragmento de código de barras, como se describe en la presente, puede fusionarse de manera escindible dentro del ELNN y liberarse (es decir, se configura para liberarse) del ELNN después de la digestión del polipéptido por una proteasa. En algunas modalidades, la proteasa es una proteasa Glu-C. En algunas modalidades, la proteasa se escinde en el lado C-terminal de los residuos de ácido glutámico que no son seguidos por prolina. En algunas modalidades, un ELNN con código de barras (un ELNN que contiene fragmento(s) de código de barras dentro de este) se diseña para lograr una alta eficiencia, precisión y exactitud de la digestión de proteasas. Por ejemplo, en algunas modalidades, los residuos de Glu-Glu (EE) adyacentes en una secuencia ELNN pueden dar como resultado patrones de escisión variables después de la digestión con Glu-C. En consecuencia, cuando se usa la proteasa Glu-C para la liberación de códigos de barras, el ELNN con código de barras o el(los) fragmento(s) de código de barras pueden no contener ninguna secuencia de Glu-Glu (EE). Adicionalmente, una secuencia de dipéptido Glu-Pro (EP), si está presente en el polipéptido de fusión, no puede escindirse por la proteasa Glu-C durante el proceso de liberación del código de barras.

PROTEÍNAS DE FUSIÓN DE CITOCINA ACTIVABLES

En un aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende: una citocina (p. ej., una interleucina, un factor de crecimiento transformador, un interferón, un factor de necrosis tumoral, una quimiocina o factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos), un enlazador (Enlazador 1) que comprende un segmento de liberación escindible por proteasa (RS1), y un polipéptido de máscara (Máscara 1), en donde el enlazador (Enlazador 1) que comprende el segmento de liberación (RS1) se posiciona entre la citocina y el polipéptido de máscara (Máscara 1); en donde el segmento de liberación es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor; y en donde el segmento de liberación (RS1) no es capaz de escindirse por legumaína en plasma humano,.

En otro aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende: una citocina (p. ej., una interleucina, un factor de crecimiento transformador, un interferón, un factor de necrosis tumoral, una quimiocina o factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos), un enlazador (Enlazador 1) que comprende un segmento de liberación escindible por proteasa (RS1), y un polipéptido de máscara (Máscara 1), en donde el enlazador (Enlazador 1) que comprende el segmento de liberación (RS1) se posiciona entre la citocina y el polipéptido de máscara (Máscara 1); en donde el segmento de liberación es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor; y en donde el segmento de liberación (RS1) se escinde por legumaína en plasma humano a una tasa que es menor que 25 % de la tasa que EAGRSANHTPAGLTGP (RSR-2295; sec. con núm. de ident.: 7048) es escindido por legumaína en plasma humano.

En aun otro aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende: una citocina (p. ej., una interleucina, un factor de crecimiento transformador, un interferón, un factor de necrosis tumoral, una quimiocina o factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos), un enlazador (Enlazador 1) que comprende un segmento de liberación escindible por proteasa (RS1), y un polipéptido de máscara (Máscara 1), en

donde el enlazador (Enlazador 1) que comprende el segmento de liberación (RS1) se posiciona entre la citocina y el polipéptido de máscara (Máscara 1); en donde el segmento de liberación es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor; y en donde el segmento de liberación (RS1) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia EAGRSAXHTPAGLTGP, en donde X es cualquier aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 7627).

En algunas modalidades, el enlazador se une al N-terminal de la citocina. En algunas modalidades, el enlazador se une al C-terminal de la citocina.

En otro aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende los siguientes elementos en una orientación de N-terminal a C-terminal o C-terminal a N-terminal: un primer polipéptido de máscara (máscara1), un primer enlazador (enlazador1) que comprende un primer segmento de liberación (RS1) escindible por proteasa, una citocina (p. ej., una interleucina, un factor de crecimiento transformador, un interferón, un factor de necrosis tumoral, una quimiocina, o factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos), un segundo enlazador (Enlazador 2) que comprende un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa, y un segundo polipéptido de máscara (Máscara 2), en donde cada segmento de liberación (RS1 y RS2) (i) no es capaz de escindirse por legumaína en plasma humano, (ii) se escinde por legumaína en plasma humano a una tasa que es menor que 25 % de la tasa que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; (sec. con núm. de ident.: 7048) ser escindido por legumaína en el plasma humano, o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia EAGRSAXHTPAGLTGP, en donde X es cualquier aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 7627).

Las citocinas que pueden incorporarse en las proteínas de fusión de la descripción pueden componerse por más de una subunidad de polipéptido. Por ejemplo, la IL-12 se compone por una subunidad de polipéptidos p35 de IL-12 y una subunidad de polipéptidos p40 de IL-12 que se unen para formar IL-12. Similarmente, la IL-23 se compone por una subunidad

de polipéptidos p19 de IL-23 y una subunidad de polipéptidos p40 de IL-12 que se unen para formar IL-23. Por lo tanto, en algunas modalidades, la proteína de fusión de la descripción comprende un primer polipéptido de subunidad que comprende una primera subunidad de una citocina, y un segundo polipéptido de subunidad que comprende una
5 segunda subunidad de la citocina.

En un aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende: a. una primera subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación de N-terminal a C-terminal o C-terminal a N-terminal: i. un primer polipéptido de máscara (máscara1, ii. un primer enlazador (Enlazador1) que comprende un primer
10 segmento de liberación (RS1) escindible por proteasa, iii. un primer polipéptido de subunidad de citocina, iv. un segundo enlazador (Enlazador2) que comprende un segundo segmento de liberación (RS2) escindible por proteasa, y v. un segundo polipéptido de máscara (Máscara2); y b. una segunda subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación de N-terminal a C-terminal o C-terminal a N-
15 terminal: i. un tercer polipéptido de máscara (Máscara3), ii. un tercer enlazador (Enlazador3) que comprende un tercer segmento de liberación (RS3) escindible por proteasa, iii. un segundo polipéptido de subunidad de citocina, iv. un cuarto enlazador (Enlazador4) que comprende un cuarto segmento de liberación (RS4) escindible por proteasa, y v. un cuarto polipéptido de máscara (Máscara4); en donde el primer polipéptido
20 de subunidad de citocina de la primera subunidad de polipéptidos y el polipéptido de la segunda subunidad de citocina de la segunda subunidad de polipéptidos se unen formando de esta manera un heterodímero unido; en donde cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor; y en donde cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) (i) no es capaz
25 de ser escindido por legumaína en el plasma humano, (ii) ser escindido por legumaína en el plasma humano a una tasa que es menor que 25 % de la tasa que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; (sec. con núm. de ident.: 7048) ser escindido por legumaína en

el plasma humano, o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia EAGRSAXHTPAGLTGP, en donde X es cualquier aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 7627).

En otro aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende:

- 5 a. una primera subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación N-a-C o C-a-N terminal:
 - i. un primer polipéptido de máscara (Máscara 1),
 - ii. un primer enlazador (Enlazador 1) que comprende un primer segmento de liberación escindible por proteasa (RS1),
 - 10 iii. un polipéptido p35 de IL-12,
 - iv. un segundo enlazador (Enlazador 2) que comprende un segundo segmento de liberación escindible por proteasa (RS2), y
 - v. un segundo polipéptido de máscara (Máscara 2); y
- b. una segunda subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en
15 una orientación N-a-C o C-a-N terminal:
 - i. un tercer polipéptido de máscara (Máscara 3),
 - ii. un tercer enlazador (Enlazador 3) que comprende un tercer segmento de liberación escindible por proteasa (RS3),
 - iii. un polipéptido p40 de IL-12,
 - 20 iv. un cuarto enlazador (Enlazador 4) que comprende un cuarto segmento de liberación escindible por proteasa (RS4), y
 - v. un cuarto polipéptido de máscara (Máscara 4);

en donde el polipéptido p35 de IL-12 de la primera subunidad de polipéptidos y el polipéptido p40 de IL-12 de la segunda subunidad de polipéptidos se unen
25 por disulfuro, formando de esta manera un heterodímero unido por disulfuro;
en donde cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor;

y en donde cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) (i) no es capaz de ser escindido por legumaína en el plasma humano, (ii) ser escindido por legumaína en el plasma humano a una tasa que es menor que 25 % de la tasa que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; (sec. con núm. de ident.: 7048) ser escindido por legumaína en el plasma humano, o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia EAGRSAXHTPAGLTGP, en donde X es cualquier aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 7627).

En algunas modalidades, el primer polipéptido de máscara (Máscara 1) comprende un primer fragmento de código de barras (Código de barras 1), el segundo polipéptido de máscara (Máscara 2) comprende un segundo fragmento de código de barras (Códigos de barras 2), el tercer polipéptido de máscara (Máscara 3) comprende un tercer fragmento de código de barras (Códigos de barras 3), y el cuarto polipéptido de máscara (Máscara 4) comprende un cuarto fragmento de código de barras (Códigos de barras 4); y en donde cada fragmento de código de barras (Código de barras 1, Código de barras 2, Código de barras 3, y Código de barras 4) se puede liberar de la proteína de fusión tras la digestión con una proteasa no mamífera, y cada fragmento de código de barras difiere tanto en secuencia como en peso molecular de todos los demás fragmentos de código de barras o fragmentos de péptidos que se pueden liberar de la proteína de fusión tras la digestión completa de la proteína de fusión por la proteasa no mamífera.

En otro aspecto, la descripción proporciona una proteína de fusión que comprende:

- a. una primera subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación N-a-C o C-a-N terminal:
 - i. un primer polipéptido de máscara (Máscara 1) que comprende un primer fragmento de código de barras (Código de barras 1),
 - ii. un primer enlazador (Enlazador 1) que comprende un primer segmento de liberación escindible por proteasa (RS1),
 - iii. un polipéptido p35 de IL-12,

- iv. un segundo enlazador (Enlazador 2) que comprende un segundo segmento de liberación escindible por proteasa (RS2), y
 - v. un segundo polipéptido de máscara (Máscara 2) que comprende un segundo fragmento de código de barras (Código de barras 2); y
- 5 b. una segunda subunidad de polipéptidos que comprende los siguientes elementos en una orientación N-a-C o C-a-N terminal:
- i. un tercer polipéptido de máscara (Máscara 3) que comprende un tercer fragmento de código de barras (Código de barras 3),
 - ii. un tercer enlazador (Enlazador 3) que comprende un tercer segmento de liberación escindible por proteasa (RS3),
 - 10 iii. un polipéptido p40 de IL-12,
 - iv. un cuarto enlazador (Enlazador 4) que comprende un cuarto segmento de liberación escindible por proteasa (RS4), y
 - v. un cuarto polipéptido de máscara (Máscara 4) que comprende un cuarto fragmento de código de barras (Código de barras 4);
- 15

en donde el polipéptido p35 de IL-12 de la primera subunidad y el polipéptido p40 de IL-12 de la segunda unidad se unen por disulfuro formando de esta manera un heterodímero unido por disulfuro;

en donde cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) es capaz de ser escindido por al menos una proteasa que está presente en un tumor;

20

y en donde cada fragmento de código de barras (Código de barras 1, Código de barras 2, Código de barras 3, y Código de barras 4) se puede liberar de la proteína de fusión tras la digestión con una proteasa no mamífera, y cada fragmento de código de barras difiere tanto en secuencia como en peso molecular de todos los demás fragmentos de código de barras o fragmentos de péptidos que se pueden liberar de la proteína de fusión tras la digestión completa de la proteína de fusión por la proteasa no mamífera.

25

En algunas modalidades, cada segmento de liberación comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad, o 100 % de identidad, con una secuencia de la Tabla 6a.

En algunas modalidades, cada segmento de liberación (RS1, RS2, RS3, y RS4) (i) no es capaz de ser escindido por legumaina en el plasma humano, (ii) ser escindido por legumaina en el plasma humano a una velocidad que es menor que 25 % de la velocidad que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; (sec. con núm. de ident.: 7048) ser escindido por legumaina en el plasma humano, o (iii) comprende una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia EAGRSAXHTPAGLTGP, en donde X es cualquier aminoácido distinto de N (sec. con núm. de ident.: 7627).

Se apreciará que se pueden hacer diversas sustituciones de aminoácidos (especialmente sustituciones de aminoácidos conservadoras) en una secuencia de proteína de fusión para crear variantes sin apartarse del espíritu de la presente descripción con respecto a la actividad biológica o propiedades farmacológicas de, p. ej., una proteína de fusión de citocina activable por proteasa. En la Tabla 4a se muestran ejemplos de sustituciones conservativas para aminoácidos en secuencias polipeptídicas. Además, las variantes también pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos en donde se añaden o eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa de una proteína de fusión que retiene al menos una porción de la actividad biológica del péptido nativo.

Tabla 4a: Sustituciones conservativas de aminoácidos ilustrativas

Residuo original	Sustituciones ilustrativas
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gin; Asn
Asn (N)	Gin; His; Lys; Arg

Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro
His (H)	Asn: Gin: Iys: Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe: Norleucina
Leu (L)	Norleucina: Ile: Val; Met; Ala: Phe
Lys (K)	Arg: Gin: Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Leu: Val: Ile; Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr(Y)	Trp: Phe: Thr: Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina

ESPACIADORES Y SEGMENTOS DE LIBERACIÓN DE CITOCINA

En la presente se incluyen proteínas de fusión que comprenden una citocina que o bien se vuelve biológicamente activa o tiene un aumento en la actividad biológica después de la liberación de un ELNN por escisión de una secuencia de escisión opcional incorporada dentro de secuencias espaciadoras opcionales en la proteína de fusión, p. ej., como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el espaciador puede proporcionarse para mejorar la expresión de la proteína de fusión desde una célula huésped y/o para disminuir el impedimento estérico de tal manera que la citocina pueda asumir su estructura terciaria deseada y/o interactuar apropiadamente con su molécula diana. Para espaciadores y métodos de

identificación de espaciadores deseables, ver, por ejemplo, George, *et al.* (2003) Protein Engineering 15:871-879, específicamente incorporado por referencia en la presente. En algunas modalidades, el espaciador comprende una o más secuencias peptídicas que tienen entre 1 a 50 residuos de aminoácidos de longitud, o aproximadamente 1 a 25

5 residuos, o aproximadamente 1 a 10 residuos de longitud. Las secuencias espaciadoras, exclusivas de los sitios de escisión, pueden comprender cualquiera de los 20 aminoácidos L naturales, y preferentemente comprenderán aminoácidos hidrófilos que están estéricamente sin impedimentos que pueden incluir, pero sin limitarse a, glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P). En algunas modalidades, el

10 espaciador puede ser una poliglicina o polialanina, o predominantemente una mezcla de combinaciones de residuos de glicina y alanina. En algunas modalidades, el polipéptido espaciador exclusivo de una secuencia de escisión está sustancialmente desprovisto de estructura secundaria. En algunas modalidades, una o ambas secuencias espaciadoras en una composición de proteína de fusión pueden contener cada una adicionalmente una

15 secuencia de escisión, que puede ser idéntica o puede ser diferente, en donde una proteasa puede actuar sobre la secuencia de escisión para liberar la citocina de la proteína de fusión.

Tabla 4b: Espaciadores ilustrativos entre un segmento de liberación y una citocina

Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
ETAPAS	89
SATPESGPGT	90
ATSGSETPGT	91
GTAEAASASG	92
STEPSEGSAPGTS	93
SGPGTS	94

Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
GTSTEPS	95
GTSESATPES	96
GTATPESGPG	97
TSESATPES	98
GTPESATPES	99
GTATPESAP	100

En algunas modalidades de los polipéptidos de esta descripción, un segmento de liberación (RS) (p. ej., un primer segmento de liberación (RS1), un segundo segmento de liberación (RS2), un tercer segmento de liberación (RS3), un cuarto segmento de liberación (RS4), etc.) puede fusionarse a una citocina mediante un espaciador. En algunas modalidades, un espaciador puede (cada uno independientemente) comprender al menos 4 tipos de aminoácidos que son glicina (G), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) o prolina (P). En algunas modalidades, la proteína de fusión de esta descripción puede comprender un primer segmento de liberación fusionado a la citocina a través de un primer espaciador y un segundo segmento de liberación fusionado a la citocina a través de un segundo espaciador. En algunas modalidades, un espaciador (p. ej., un primer espaciador, un segundo espaciador, etc.) puede (cada uno independientemente) comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 80 %, al menos (aproximadamente) 90 %, o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en la Tabla C. En algunas modalidades, el espaciador (p. ej., el primer espaciador, el segundo espaciador, etc.) puede (cada uno independientemente) comprender una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia establecida en la Tabla C.

En algunas modalidades, la incorporación de la secuencia de escisión en una proteína de fusión se diseña para permitir la liberación de una citocina que se vuelve activa o más

activa después de su liberación de uno o más ELNN. En algunas modalidades, las secuencias de escisión se localizan suficientemente cerca de las secuencias de citocina, generalmente dentro de 18, o dentro de 12, o dentro de 6, o dentro de 2 aminoácidos del extremo de la secuencia de citocina, de tal manera que cualquier resto de residuos unidos a la citocina después de la escisión no interfiera apreciablemente con la actividad (p. ej., tal como la unión a un receptor) de la citocina, sin embargo, proporcionan suficiente acceso a la proteasa para ser capaz de efectuar la escisión de la secuencia de escisión. En algunas modalidades, el sitio de escisión es una secuencia que puede escindirse por una proteasa endógena del sujeto mamífero de tal manera que una proteína de fusión puede escindirse después de la administración a un sujeto. En tales casos, la proteína de fusión puede servir como depósito circulante para la citocina. Los ejemplos de sitios de escisión contemplados en la presente incluyen, pero no se limitan a, una secuencia de polipéptidos escindible por una proteasa endógena de mamífero enumerada en la Tabla 5.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende secuencias espaciadoras que comprenden una o más secuencias de escisión configuradas para liberar la citocina de la proteína de fusión cuando actúa sobre ella una proteasa. En algunas modalidades, una secuencia espaciadora no comprende una secuencia de escisión. En algunas modalidades, la una o más secuencias de escisión pueden ser una secuencia que tiene al menos aproximadamente 80 % (p. ej., al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o 100 %) de secuencia que se identifica con una secuencia de la Tabla 6a o 6b.

En algunas modalidades, la descripción proporciona polipéptidos del segmento de liberación de citocina (o segmentos de liberación (RS)) que son sustratos para una o más proteasas de mamífero asociadas con o producidas por tejidos de enfermedad o células que se encuentran cerca de tejidos enfermos. La una o más proteasas de mamífero están

presentes en un tumor. La una o más proteasas de mamífero se pueden expresar por células cancerosas dentro del tumor o por células no cancerosas dentro del tumor. Tales proteasas pueden incluir, pero no limitarse a, las clases de proteasas tales como metaloproteinasas, proteasas de cisteína, proteasas de aspartato y proteasas de serina, que incluyen, pero no se limitan a, las proteasas de la Tabla 5. Los RS son útiles para, entre otras cosas, la incorporación a los polipéptidos recombinantes sujeto, confiriendo un formato inactivo que puede activarse por la escisión de los RS por proteasas de mamífero. Como se describe en la presente, las RS se incorporan en las composiciones polipeptídicas recombinantes sujeto, uniendo las citocinas incorporadas al ELNN (configuraciones ilustrativas de las cuales se describen en la presente) de tal manera que después de la escisión de las RS por acción de una o más proteasas para las que los RS son sustratos, las citocinas y ELNN se liberan de la composición y las citocinas, que ya no están blindadas por el ELNN, recuperan su potencial completo para unir sus ligandos.

Table 5: Proteasas de tejidos diana

Clase de proteasas	Proteasa
Metaloproteinasas	Meprina
	Neprilisina (CD10)
	PSMA
	BMP-1
	Disintegrina y metaloproteinasas A (ADAM, por sus siglas en inglés)
	ADAM8
	ADAM9
	ADAM10
	ADAM12

Clase de proteasas	Proteasa
	ADAM15
	ADAM17 (TACE)
	ADAM19
	ADAM28 (MDC-L)
	ADAM con motivos de trombospondina (ADAMTS, por sus siglas en inglés)
	ADAMTS1
	ADAMTS4
	ADAMTS5
	Metaloproteinasas de matriz (MMP, por sus siglas en inglés)
	MMP-1 (colagenasa 1)
	MMP-2 (gelatinasa A)
	MMP-3 (m1)
	MMP-7 (matrilisina 1)
	MMP-8 (colagenasa 2)
	MMP-9 (gelatinasa B)
	MMP-10 (estromelisina 2)
	MMP-11 (estromelisina 3)
	MMP-12 (elastasa de macrófagos)
	MMP-13 (colagenasa 3)
	MMP-14 (MT1-MMP)
	MMP-15 (MT2-MMP)
	MMP-19
	MMP-23 (CA-MMP)
	MMP-24 (MT5-MMP)
	MMP-26 (matrilisina 2)

Clase de proteasas	Proteasa
	MMP-27 (CMMP)
Proteasas de cisteína	Legumaína
	Catepsinas de cisteína
	Catepsina B
	Catepsina C
	Catepsina K
	Catepsina L
	Catepsina S
	Catepsina X
Proteasas de aspartato	Catepsina D
	Catepsina E
	Secretasa
Proteasas de serina	Uroquinasa (uPA)
	Activador tisular del plasminógeno (tPA)
	Plasmina
	Trombina
	Antígeno prostático específico (PSA, KLK3)
	Elastasa de neutrófilos humanos (HNE, por sus siglas en inglés)
	Elastasa
	Triptasa
	Proteasas de serina de transmembrana tipo II (TTSP, por sus siglas en inglés)
	DESC1
	Hepsina (HPN)
	Matriptasa
	Matriptasa-2

Clase de proteasas	Proteasa
	TMPRSS2
	TMPRSS3
	TMPRSS4 (CAP2)
	Proteína de activación de fibroblastos (FAP, por sus siglas en inglés)
	peptidasa relacionada con la calicreína (familia KLK)
	KLK4
	KLK5
	KLK6
	KLK7
	KLK8
	KLK10
	KLK11
	KLK13
	KLK14

En algunas modalidades, la descripción proporciona polipéptidos recombinantes activables (p. ej., proteínas de fusión) que comprenden una secuencia del primer segmento de liberación (RS1) que tiene al menos 88 %, o al menos 94 %, o 100 % de identidad de secuencia, cuando se alinean óptimamente, a una secuencia identificada en la Tabla 6a, en donde el RS1 es un sustrato para una o más proteasas de mamífero. En algunas modalidades, el RS se diseña además para eliminar un sitio de escisión de legumainas. En algunas modalidades, la descripción proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden una secuencia de RS1 y una segunda secuencia de segmento de liberación (RS2), cada uno tiene al menos 88 %, o al menos 94 %, o 100 % de identidad de secuencia, cuando se alinean óptimamente, con una secuencia identificada en la

presente por las secuencias establecidas en la Tabla 6a, en donde el RS1 y el RS2 son cada uno un sustrato para una o más proteasas de mamífero. En algunas modalidades, la descripción proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden una secuencia de RS1, un RS2, una tercera secuencia de segmento de liberación (RS3) y una cuarta secuencia de segmento de liberación (RS4), cada una tiene al menos 88 %, o al menos 94 %, o 100 % de identidad de secuencia, cuando se alinean óptimamente, a una secuencia identificada en la presente por las secuencias expuestas en la Tabla 6a, en donde el RS1, el RS2, el RS3 y el RS4 cada uno es un sustrato para una o más proteasas de mamífero. En algunas modalidades, el RS1, el RS2, el RS3 y el RS4 cada uno no sirven como sustratos para la legumaina.

En algunas modalidades, la descripción proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden una primera secuencia de RS (RS1) que tiene al menos 90 %, al menos 93 %, al menos 97 % o 100 % de identidad, cuando se alinean óptimamente, con una secuencia identificada en la Tabla 6b, en donde el RS1 es un sustrato para una o más proteasas de mamífero. En algunas modalidades, la descripción proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden una secuencia de RS1 y una segunda secuencia de segmento de liberación (RS2), cada uno tiene al menos 88 %, o al menos 94 %, o 100 % de identidad de secuencia, cuando se alinean óptimamente, con una secuencia identificada en la presente por las secuencias expuestas en la Tabla 6b, en la que RS1 y el RS2 son cada uno un sustrato para una o más proteasas de mamífero (p. ej., en una, dos o tres sitios de escisión dentro de cada secuencia de segmento de liberación). En algunas modalidades, la descripción proporciona polipéptidos recombinantes activables que comprenden una secuencia de RS1, un RS2, una tercera secuencia de segmento de liberación (RS3) y una cuarta secuencia de segmento de liberación (RS4), cada una tiene al menos 88 %, o al menos 94 %, o 100 % de identidad de secuencia, cuando se alinean óptimamente, a una secuencia identificada en la presente por las secuencias expuestas en la Tabla 6b, en donde el RS1, el RS2, el RS3 y el RS4 son cada uno un sustrato para una

o más proteasas de mamífero (p. ej., en uno, dos o tres sitios de escisión dentro de cada secuencia de segmento de liberación). En algunas modalidades de polipéptidos recombinantes activables que comprenden el RS1, el RS2, el RS3 y el RS4, los cuatro segmentos de liberación pueden ser idénticos. En algunas modalidades de polipéptidos recombinantes activables que comprenden el RS1, el RS2, el RS3 y el RS4, los cuatro segmentos de liberación pueden ser diferentes.

La presente descripción contempla segmentos de liberación que son sustratos para una, dos o tres clases diferentes de proteasas que son metaloproteinasas, proteasas de cisteína, proteasas de aspartato, o proteasas de serina, que incluye las proteasas de la Tabla 5. En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende RS (p. ej., RS1, RS2, RS3 y RS4) que sirven como sustratos para una o más proteasas encontradas en estrecha asociación con o se posicionalizan con tumores o células cancerosas, y después de la escisión de las RS, las citocinas que de cualquier otra manera están blindadas por los ELNN de la proteína de fusión (y por lo tanto tienen una afinidad de unión menor para sus respectivos ligandos) se liberan de los ELNN y recuperan todo su potencial para unirse a ligandos de células diana y efectoras. En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende RS (p. ej., RS1 y RS2), cada una de los cuales comprende una secuencia de aminoácidos que es un sustrato para una o más proteasas celulares ubicadas dentro de una célula diana, que incluye, pero no se limita a, una proteasa de la Tabla 5. En algunas modalidades, los RS son sustratos para dos o tres clases de proteasas que escinden diferentes porciones de cada RS. En algunas modalidades, cada RS que es un sustrato para dos, tres o más clases de proteasas tiene dos, tres o más sitios de escisión distintos, pero la escisión por una única proteasa, sin embargo, da como resultado la liberación de las citocinas de un ELNN.

En algunas modalidades, un RS de la descripción para su incorporación en una proteína de fusión es un sustrato para una o más proteasas que incluyen pero no se limitan a meprina, neprilisina (CD10), PSMA, BMP-1, desintegrina A y metaloproteinasas (ADAM),

ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17 (TACE), ADAM19, ADAM28 (MDC-L), ADAM con motivos de trombospondina (ADAMTS), ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5, MMP-1 (colagenasa 1), metaloproteinasa-1 de matriz (MMP-1), metaloproteinasa de matriz-2 (MMP-2, gelatinasa A), metaloproteinasa de matriz-3 (MMP-3, estromelisina 1), metaloproteinasa de matriz-7 (MMP-7, matrilisina 1), metaloproteinasa de matriz-8 (MMP-8, colagenasa 2), metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9, gelatinasa B), metaloproteinasa de matriz-10 (MMP-10, estromelisina 2), metaloproteinasa de matriz-11 (MMP-11, estromelisina 3), metaloproteinasa de matriz-12 (MMP-12, elastasa de macrófagos), metaloproteinasa de matriz-13 (MMP-13, colagenasa 3), metaloproteinasa de matriz-14 (MMP-14, MT1-MMP), metaloproteinasa de matriz-15 (MMP-15, MT2-MMP), metaloproteinasa de matriz-19 (MMP-19), metaloproteinasa de matriz-23 (MMP-23, CA-MMP), metaloproteinasa de matriz-24 (MMP-24, MT5-MMP), metaloproteinasa de matriz-26 (MMP-26, matrilisina 2), metaloproteinasa de matriz-27 (MMP-27, CMMP), legumaína, catepsina B, catepsina C, catepsina K, catepsina L, catepsina S, catepsina X, catepsina D, catepsina E, secretasa, uroquinasa (uPA), activador del plasminógeno tisular (tPA), plasmina, trombina, antígeno prostático específico (PSA, KLK3), elastasa de neutrófilos humanos (HNE), elastasa, triptasa, proteasas de serina de transmembrana tipo II (TTSP), DESC1, hepsina (HPN), matriptasa, matriptasa-2, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 (CAP2), proteína de activación de fibroblastos (FAP), peptidasa relacionada con la calicreína (familia KLK), KLK4, KLK5, KLK6, KLK7, KLK8, KLK10, KLK11, KLK13, y KLK14.

En algunas modalidades, el RS es un sustrato para ADAM17. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para BMP-1. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para catepsina. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para HtrA1. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para legumaína. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-1. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-2. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-7. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-9. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-11.

En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MMP-14. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para uPA. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para matriptasa. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para MT-SP1. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para la elastasa de neutrófilos. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para trombina. En algunas modalidades RS es un sustrato para TMPRSS3. En algunas modalidades, el RS es un sustrato para TMPRSS4. En algunas modalidades, el RS de las composiciones polipeptídicas recombinantes sujeto es un sustrato para al menos dos proteasas que incluyen, pero no se limitan a, legumaína, MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-14, uPA, y matriptasa. En algunas modalidades, el RS de las composiciones polipeptídicas recombinantes sujeto es un sustrato para legumaína, MMP-1, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, MMP-14, uPA, y matriptasa. En modalidades específicas, el RS de las composiciones polipeptídicas recombinantes sujeto no es un sustrato para legumaína. En algunas modalidades, el RS de las composiciones polipeptídicas recombinantes sujeto es un sustrato para uPA, matriptasa (también conocida como MT-SP1 y ST14), MMP2, MMP7, MMP9 y MMP14. En algunas modalidades, el RS de las composiciones polipeptídicas recombinantes sujeto es sustrato para uPA, matriptasa, MMP2, MMP7, MMP9 y MMP14 pero no legumaína.

Tabla 6a: Secuencias de segmentos de liberación de proteínas de fusión.

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSR-1517	EAGRSANHEPLGLVAT	7001
BSRS-A1-1	ASGRSTNAGPSGLAGP	7002
BSRS-A2-1	ASGRSTNAGPQGLAGQ	7003
BSRS-A3-1	ASGRSTNAGPPGLTGP	7004
VP-1	ASSRGTNAGPAGLTGP	7005

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSR-1752	ASSRTTNTGPGSTLTGP	7006
RSR-1512	AAGRSDNGTPLELVAP	7007
RSR-1517	EAGRSANHEPLGLVAT	7008
VP-2	ASGRGTNAGPAGLTGP	7009
RSR-1018	LFGRNDNHEPLELGGG	7010
RSR-1053	TAGRSDNLEPLGLVFG	7011
RSR-1059	LDGRSDNFHPPELVAG	7012
RSR-1065	LEGRSDNEEPENLVAG	7013
RSR-1167	LKGRSDNNAPLALVAG	7014
RSR-1201	VYSRGTNAGPHGLTGR	7015
RSR-1218	ANSRGTNKGFAGLIGP	7016
RSR-1226	ASSRLTNEAPAGLTIP	7017
RSR-1254	DQSRGTNAGPEGLTDP	7018
RSR-1256	ESSRGTNIGQGGLTGP	7019
RSR-1261	SSSRGTNQDPAGLTIP	7020
RSR-1293	ASSRGQNHSPMGLTGP	7021
RSR-1309	AYSRGPNAGPAGLEGR	7022
RSR-1326	ASERGNNAGPANLTGF	7023
RSR-1345	ASHRGTNPKPAILTGP	7024
RSR-1354	MSSRRTNANPAQLTGP	7025
RSR-1426	GAGRDTNHEPLELGAA	7026
RSR-1478	LAGRSENTAPLELTAG	7027
RSR-1479	LEGRPDNHEPLALVAS	7028
RSR-1496	LSGRSDNEEPLALPAG	7029
RSR-1508	EAGRDTNHEPLELSAP	7030
RSR-1513	EGGRSDNHGPLELVSG	7031

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSR-1516	LSGRSDNEAPLELEAG	7032
RSR-1524	LGGRADNHEPPELGAG	7033
RSR-1622	PPSRGTNAEPAGLTGE	7034
RSR-1629	ASTRGENAGPAGLEAP	7035
RSR-1664	ESSRGTNGAPEGLTGP	7036
RSR-1667	ASSRATNESPAGLTGE	7037
RSR-1709	ASSRGENPPPGGLTGP	7038
RSR-1712	AASRGTTNTGPAELTGS	7039
RSR-1727	AGSRTTNAGPGGLEGP	7040
RSR-1754	APSRGENAGPATLTGA	7041
RSR-1819	ESGRAANTGPPTLTAP	7042
RSR-1832	NPGRAANEGPPGLPGS	7043
RSR-1855	ESSRAANLTPPELTGP	7044
RSR-1911	ASGRAANETPPGLTGA	7045
RSR-1929	NSGRGENLGAPGLTGT	7046
RSR-1951	TTGRAANLTPAGLTGP	7047
RSR-2295	EAGRSANHTPAGLTGP	7048
RSR-2298	ESGRAANTTPAGLTGP	7049
RSR-2038	TTGRATEAANLTPAGLTGP	7050
RSR-2072	TTGRAEEAANLTPAGLTGP	7051
RSR-2089	TTGRAGEAANLTPAGLTGP	7052
RSR-2302	TTGRATEAANATPAGLTGP	7053
RSR-3047	TTGRAGEAEGATSAGATGP	7054
RSR-3052	TTGEAGEAANATSAGATGP	7055
RSR-3043	TTGEAGEAAGLTPAGLTGP	7056
RSR-3041	TTGAAGEAANATPAGLTGP	7057

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSR-3044	TTGRAGEAAGLTPAGLTGP	7058
RSR-3057	TTGRAGEAANATSAGATGP	7059
RSR-3058	TTGEAGEAAGATSAGATGP	7060
RSR-2485	ESGRAANTEPELGAG	7061
RSR-2486	ESGRAANTAPEGLTGP	7062
RSR-2488	EPGRAANHEPSGLTEG	7063
RSR-2599	ESGRAANHTGAPPGGLTGP	7064
RSR-2706	TTGRTGEGANATPGGLTGP	7065
RSR-2707	RTGRSGEAANETPEGLEGP	7066
RSR-2708	RTGRTGESANETPAGLGGP	7067
RSR-2709	STGRTGEPANETPAGLSGP	7068
RSR-2710	TTGRAGEPANATPTGLSGP	7069
RSR-2711	RTGRPGEGANATPTGLPGP	7070
RSR-2712	RTGRGGEAANATPSGLGGP	7071
RSR-2713	STGRSGESANATPGGLGGP	7072
RSR-2714	RTGRTGEEANATPAGLPGP	7073
RSR-2715	GRPGEPANTTPEGLEGP	7074
RSR-2716	STGRSGEPANATPGGLTGP	7075
RSR-2717	PTGRGGEGANATTPTGLPGP	7076
RSR-2718	PTGRSGEGANATPSGLTGP	7077
RSR-2719	TTGRASEGANSTPAPLTEP	7078
RSR-2720	TYGRAAEAANTTPAGLTAP	7079
RSR-2721	TTGRATEGANATPAELTEP	7080
RSR-2722	TVGRASEEANTTPASLTGP	7081
RSR-2723	TTGRAPEAANATPAPLTGP	7082
RSR-2724	TWGRATEPANATPAPLTSP	7083

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSR-2725	TVGRASESANATPAELTSP	7084
RSR-2726	TVGRAPEGANSTPAGLTGP	7085
RSR-2727	TWGRATEAPNLEPATLTTP	7086
RSR-2728	TTGRATEAPNLTPAPLTEP	7087
RSR-2729	TQGRATEAPNLSPAALTSP	7088
RSR-2730	TQGRAAEAPNLTPATLTAP	7089
RSR-2731	TSGRAPEATNLAPAPLTGP	7090
RSR-2732	TQGRAAEAAANLTPAGLTEP	7091
RSR-2733	TTGRAGSAPNLPPTGLTTP	7092
RSR-2734	TTGRAGGAENLPPEGLTAP	7093
RSR-2735	TTSRAGTATNLTPPEGLTAP	7094
RSR-2736	TTGRAGTATNLPPSGLTTP	7095
RSR-2737	TTARAGEAENLSPSGLTAP	7096
RSR-2738	TTGRAGGAGNLAPGGLTEP	7097
RSR-2739	TTGRAGTATNLPPPEGLTGP	7098
RSR-2740	TTGRAGGAANLAPTGLTEP	7099
RSR-2741	TTGRAGTAENLAPSGLTTP	7100
RSR-2742	TTGRAGSATNLGPGGLTGP	7101
RSR-2743	TTARAGGAENLTPAGLTEP	7102
RSR-2744	TTARAGSAENLSPSGLTGP	7103
RSR-2745	TTARAGGAGNLAPEGLTTP	7104
RSR-2746	TTSRAGAAENLTPTGLTGP	7105
RSR-2747	TYGRTTTPGNEPPASLEAE	7106
RSR-2748	TYSRGESGPNEPPPGLTGP	7107
RSR-2749	AWGRTGASENETPAPLGGE	7108
RSR-2750	RWGRAETTPNTPPEGLETE	7109

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSR-2751	ESGRAANHTGAEPPELGAG	7110
RSR-2754	TTGRAGEAANLTPAGLTES	7111
RSR-2755	TTGRAGEAANLTPAALTES	7112
RSR-2756	TTGRAGEAANLTPAPLTES	7113
RSR-2757	TTGRAGEAANLTPEPLTES	7114
RSR-2758	TTGRAGEAANLTPAGLTGA	7115
RSR-2759	TTGRAGEAANLTPEGLTGA	7116
RSR-2760	TTGRAGEAANLTPEPLTGA	7117
RSR-2761	TTGRAGEAANLTPAGLTEA	7118
RSR-2762	TTGRAGEAANLTPEGLTEA	7119
RSR-2763	TTGRAGEAANLTPAPLTEA	7120
RSR-2764	TTGRAGEAANLTPEPLTEA	7121
RSR-2765	TTGRAGEAANLTPEPLTGP	7122
RSR-2766	TTGRAGEAANLTPAGLTGG	7123
RSR-2767	TTGRAGEAANLTPEGLTGG	7124
RSR-2768	TTGRAGEAANLTPEALTGG	7125
RSR-2769	TTGRAGEAANLTPEPLTGG	7126
RSR-2770	TTGRAGEAANLTPAGLTEG	7127
RSR-2771	TTGRAGEAANLTPEGLTEG	7128
RSR-2772	TTGRAGEAANLTPAPLTEG	7129
RSR-2773	TTGRAGEAANLTPEPLTEG	7130
RSR-3213	EAGRSASHTPAGLTGP	7628

Tabla 6b: Secuencias de segmentos de liberación

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0001	GSAPGSAGGY AELRMGGAIAT SGSETPGT	7131	RSC-0001	GTAEAASASGG SAGGYAELRM GGAIPGSP	7379
RSN-0002	GSAPGTGGGY APLRMGGGAA TSGSETPGT	7132	RSC-0002	GTAEAASASGG TGGGYAPLRM GGGAPGSP	7380
RSN-0003	GSAPGAEGGY AALRMGGEIAT SGSETPGT	7133	RSC-0003	GTAEAASASGG AEGGYAALRM GGEIPGSP	7381
RSN-0004	GSAPGGPGGY ALLRMGGPAAT SGSETPGT	7134	RSC-0004	GTAEAASASGG GPGGYALLRM GGPAPGSP	7382
RSN-0005	GSAPGEAGGY AFLRMGGSIAT SGSETPGT	7135	RSC-0005	GTAEAASASGG EAGGYAFLRM GGSIPGSP	7383
RSN-0006	GSAPGPGGGY ASLRMGGTAAT SGSETPGT	7136	RSC-0006	GTAEAASASGG PGGGYASLRM GGTAPGSP	7384
RSN-0007	GSAPGSEGGY ATLRMGGAIAT SGSETPGT	7137	RSC-0007	GTAEAASASGG SEGGYATLRM GGAIPGSP	7385
RSN-0008	GSAPGTPGGY ANLRMGGGAA TSGSETPGT	7138	RSC-0008	GTAEAASASGG TPGGYANLRM GGGAPGSP	7386

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0009	GSAPGASGGY AHLRMGGEIAT SGSETPGT	7139	RSC-0009	GTAEAASASGG ASGGYAHLRM GGEIPGSP	7387
RSN-0010	GSAPGGTGGY GELRMGGPAA TSGSETPGT	7140	RSC-0010	GTAEAASASGG GTGGYGELRM GGPAPGSP	7388
RSN-0011	GSAPGEAGGY PELRMGGS IAT SGSETPGT	7141	RSC-0011	GTAEAASASGG EAGGYPELRM GGSIPGSP	7389
RSN-0012	GSAPGPGGGY VELRMGGTAAT SGSETPGT	7142	RSC-0012	GTAEAASASGG PGGGYVELRM GGTAPGSP	7390
RSN-0013	GSAPGSEGGYL ELRMGGAIATS GSETPGT	7143	RSC-0013	GTAEAASASGG SEGGYLELRMG GAIPGSP	7391
RSN-0014	GSAPGTPGGY SELRMGGGAA TSGSETPGT	7144	RSC-0014	GTAEAASASGG TPGGYSELRM GGGAPGSP	7392
RSN-0015	GSAPGASGGY TELRMGGEIAT SGSETPGT	7145	RSC-0015	GTAEAASASGG ASGGYTELRM GGEIPGSP	7393
RSN-0016	GSAPGGTGGY QELRMGGPAA TSGSETPGT	7146	RSC-0016	GTAEAASASGG GTGGYQELRM GGPAPGSP	7394

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0017	GSAPGEAGGY EELRMGGS IATSGSETPGT	7147	RSC-0017	GTAEAAASASGG EAGGYEELRM GGSIPGSP	7395
RSN-0018	GSAPGPGIGPA ELRMGGTAATS GSETPGT	7148	RSC-0018	GTAEAAASASGG PGIGPAELRMG GTAPGSP	7396
RSN-0019	GSAPGSEIGAA ELRMGGAIATS GSETPGT	7149	RSC-0019	GTAEAAASASGG SEIGAAELRMG GAIPGSP	7397
RSN-0020	GSAPGTPIGSA ELRMGGGAAT SGSETPGT	7150	RSC-0020	GTAEAAASASGG TPIGSAELRMG GGAPGSP	7398
RSN-0021	GSAPGASIGTA ELRMGGEIATS GSETPGT	7151	RSC-0021	GTAEAAASASGG ASIGTAELRMG GEIPGSP	7399
RSN-0022	GSAPGGTIGNA ELRMGGPAATS GSETPGT	7152	RSC-0022	GTAEAAASASGG GTIGNAELRMG GPAPGSP	7400
RSN-0023	GSAPGEAIGQA ELRMGGS IATSGSETPGT	7153	RSC-0023	GTAEAAASASGG EAIGQAELRMG GSIPGSP	7401
RSN-0024	GSAPGPGGPY AELRMGGTAAT SGSETPGT	7154	RSC-0024	GTAEAAASASGG PGGPYAELRM GGTAPGSP	7402

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0025	GSAPGSEGAYA ELRMGGAIATS GSETPGT	7155	RSC-0025	GTAEAASASGG SEGAYAELRMG GAIPGSP	7403
RSN-0026	GSAPGTPGVYA ELRMGGGAAT SGSETPGT	7156	RSC-0026	GTAEAASASGG TPGVYAELRMG GGAPGSP	7404
RSN-0027	GSAPGASGLYA ELRMGGEIATS GSETPGT	7157	RSC-0027	GTAEAASASGG ASGLYAELRMG GEIPGSP	7405
RSN-0028	GSAPGGTGIYA ELRMGGPAATS GSETPGT	7158	RSC-0028	GTAEAASASGG GTGIYAELRMG GPAPGSP	7406
RSN-0029	GSAPGEAGFYA ELRMGGSIAATS GSETPGT	7159	RSC-0029	GTAEAASASGG EAGFYAELRMG GSIPGSP	7407
RSN-0030	GSAPGPGGY AELRMGGTAAT SGSETPGT	7160	RSC-0030	GTAEAASASGG PGGYAELRM GGTAPGSP	7408
RSN-0031	GSAPGSEGSYA ELRMGGAIATS GSETPGT	7161	RSC-0031	GTAEAASASGG SEGSYAELRMG GAIPGSP	7409
RSN-0032	GSAPGTPGNYA ELRMGGGAAT SGSETPGT	7162	RSC-0032	GTAEAASASGG TPGNYAELRMG GGAPGSP	7410

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0033	GSAPGASGEYA ELRMGGEIATS GSETPGT	7163	RSC-0033	GTAEAASASGG ASGEYAELRMG GEIPGSP	7411
RSN-0034	GSAPGGTGHY AELRMGGPAAT SGSETPGT	7164	RSC-0034	GTAEAASASGG GTGHYAELRM GGPAPGSP	7412
RSN-0035	GSAPGEAGGY AEARMGGSIAT SGSETPGT	7165	RSC-0035	GTAEAASASGG EAGGYAEARM GGSIPGSP	7413
RSN-0036	GSAPGPGGGY AEVRMGGTAAT SGSETPGT	7166	RSC-0036	GTAEAASASGG PGGGYAEVRM GGTAPGSP	7414
RSN-0037	GSAPGSEGGY AEIRMGGAIATS GSETPGT	7167	RSC-0037	GTAEAASASGG SEGGYAEIRMG GAIPGSP	7415
RSN-0038	GSAPGTPGGY AEFRMGGGAA TSGSETPGT	7168	RSC-0038	GTAEAASASGG TPGGYAEFRM GGGAPGSP	7416
RSN-0039	GSAPGASGGY AEYRMGGEIAT SGSETPGT	7169	RSC-0039	GTAEAASASGG ASGGYAEYRM GGEIPGSP	7417
RSN-0040	GSAPGGTGGY AESRMGGPAA TSGSETPGT	7170	RSC-0040	GTAEAASASGG GTGGYAESRM GGPAPGSP	7418

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0041	GSAPGEAGGY AETRMGGSIAT SGSETPGT	7171	RSC-0041	GTAEAASASGG EAGGYAETRM GGSIPGSP	7419
RSN-0042	GSAPGPGGGY AELAMGGTRAT SGSETPGT	7172	RSC-0042	GTAEAASASGG PGGGYAELAM GGTRPGSP	7420
RSN-0043	GSAPGSEGGY AELVMGGARAT SGSETPGT	7173	RSC-0043	GTAEAASASGG SEGGYAELVM GGARPGSP	7421
RSN-0044	GSAPGTPGGY AELLMGGGRAT SGSETPGT	7174	RSC-0044	GTAEAASASGG TPGGYAELLMG GGRPGSP	7422
RSN-0045	GSAPGASGGY AELIMGGERAT SGSETPGT	7175	RSC-0045	GTAEAASASGG ASGGYAELIMG GERPGSP	7423
RSN-0046	GSAPGGTGGY AELWMGGPRA TSGSETPGT	7176	RSC-0046	GTAEAASASGG GTGGYAELWM GGPRPGSP	7424
RSN-0047	GSAPGEAGGY AELSMGGSRAT SGSETPGT	7177	RSC-0047	GTAEAASASGG EAGGYAELSM GGS RPGSP	7425
RSN-0048	GSAPGPGGGY AELTMGGTRAT SGSETPGT	7178	RSC-0048	GTAEAASASGG PGGGYAELTM GGTRPGSP	7426

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0049	GSAPGSEGGY AELQMGGARA TSGSETPGT	7179	RSC-0049	GTAEAASASGG SEGGYAELQM GGARPGSP	7427
RSN-0050	GSAPGTPGGY AELNMGGGRA TSGSETPGT	7180	RSC-0050	GTAEAASASGG TPGGYAELNM GGGRPGSP	7428
RSN-0051	GSAPGASGGY AELEMGGERAT SGSETPGT	7181	RSC-0051	GTAEAASASGG ASGGYAELEM GGERPGSP	7429
RSN-0052	GSAPGGTGGY AELRPGGPIAT SGSETPGT	7182	RSC-0052	GTAEAASASGG GTGGYAELRPG GPIPGSP	7430
RSN-0053	GSAPGEAGGY AELRAGGSAAT SGSETPGT	7183	RSC-0053	GTAEAASASGG EAGGYAELRAG GSAPGSP	7431
RSN-0054	GSAPGPGGGY AELRLGGTIATS GSETPGT	7184	RSC-0054	GTAEAASASGG PGGGYAELRLG GTIPGSP	7432
RSN-0055	GSAPGSEGGY AELRIGGAAAT SGSETPGT	7185	RSC-0055	GTAEAASASGG SEGGYAELRIG GAAPGSP	7433
RSN-0056	GSAPGTPGGY AELRSGGGIAT SGSETPGT	7186	RSC-0056	GTAEAASASGG TPGGYAELRSG GGIPGSP	7434

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0057	GSAPGASGGY AELRNGGEAAT SGSETPGT	7187	RSC-0057	GTAEAASASGG ASGGYAELRNG GEAPGSP	7435
RSN-0058	GSAPGGTGGY AELRQGGPIAT SGSETPGT	7188	RSC-0058	GTAEAASASGG GTGGYAELRQ GGPIPGSP	7436
RSN-0059	GSAPGEAGGY AELRDGGSAAAT SGSETPGT	7189	RSC-0059	GTAEAASASGG EAGGYAELRDG GSAPGSP	7437
RSN-0060	GSAPGPGGGY AELREGGTIATS GSETPGT	7190	RSC-0060	GTAEAASASGG PGGGYAELRE GGTIPGSP	7438
RSN-0061	GSAPGSEGGY AELRHGGAAAT SGSETPGT	7191	RSC-0061	GTAEAASASGG SEGGYAELRHG GAAPGSP	7439
RSN-0062	GSAPGTPGGY AELRMPGGIAT SGSETPGT	7192	RSC-0062	GTAEAASASGG TPGGYAELRMP GGIPGSP	7440
RSN-0063	GSAPGASGGY AELRMAGEAAT SGSETPGT	7193	RSC-0063	GTAEAASASGG ASGGYAELRMA GEAPGSP	7441
RSN-0064	GSAPGGTGGY AELRMVGPIAT SGSETPGT	7194	RSC-0064	GTAEAASASGG GTGGYAELRM VGPIPGSP	7442

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0065	GSAPGEAGGY AELRMLGSAAT SGSETPGT	7195	RSC-0065	GTAEAASASGG EAGGYAELRML GSAPGSP	7443
RSN-0066	GSAPGPGGGY AELRMIGTIATS GSETPGT	7196	RSC-0066	GTAEAASASGG PGGGYAELRMI GTIPGSP	7444
RSN-0067	GSAPGSEGGY AELRMYGAIAT SGSETPGT	7197	RSC-0067	GTAEAASASGG SEGGYAELRMY GAIPGSP	7445
RSN-0068	GSAPGTPGGY AELRMSGGAAT SGSETPGT	7198	RSC-0068	GTAEAASASGG TPGGYAELRMS GGAPGSP	7446
RSN-0069	GSAPGASGGY AELRMNGEIAT SGSETPGT	7199	RSC-0069	GTAEAASASGG ASGGYAELRM NGEIPGSP	7447
RSN-0070	GSAPGGTGGY AELRMQGPAAT SGSETPGT	7200	RSC-0070	GTAEAASASGG GTGGYAELRM QGPAPGSP	7448
RSN-0071	GSAPGANHTPA GLTGPGARATS GSETPGT	7201	RSC-0071	GTAEAASASGG ANHTPAGLTGP GARPGSP	7449
RSN-0072	GSAPGANTAPE GLTGPSTRATS GSETPGT	7202	RSC-0072	GTAEAASASGG ANTAPEGLTGP STRPGSP	7450

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0073	GSAPGTGAPP GGLTGPGTRAT SGSETPGT	7203	RSC-0073	GTAEAASASGG TGAPPGGLTGP GTRPGSP	7451
RSN-0074	GSAPGANHEPS GLTEGSPRATS GSETPGT	7204	RSC-0074	GTAEAASASGG ANHEPSGLTEG SPRPGSP	7452
RSN-0075	GSAPGANTEPP ELGAGTERATS GSETPGT	7205	RSC-0075	GTAEAASASGG ANTEPPELGAG TERPGSP	7453
RSN-0076	GSAPGASGPPP GLTGPPGRATS GSETPGT	7206	RSC-0076	GTAEAASASGG ASGPPPGLTGP PGRPGSP	7454
RSN-0077	GSAPGASGTPA PLGGEPGRATS GSETPGT	7207	RSC-0077	GTAEAASASGG ASGTPAPLGGE PGRPGSP	7455
RSN-0078	GSAPGPAGPPE GLETEAGRATS GSETPGT	7208	RSC-0078	GTAEAASASGG PAGPPEGLETE AGRPGSP	7456
RSN-0079	GSAPGPTSGQ GGLTGPESRAT SGSETPGT	7209	RSC-0079	GTAEAASASGG PTSGQGGLTGP ESRPGSP	7457
RSN-0080	GSAPGSAGGA ANLVRGGAIAT SGSETPGT	7210	RSC-0080	GTAEAASASGG SAGGAANLVRG GAIPGSP	7458

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0081	GSAPGTGGGA APLVRGGGAAT SGSETPGT	7211	RSC-0081	GTAEAASASGG TGGGAAPLVRG GGAPGSP	7459
RSN-0082	GSAPGAEGGA AALVRGGEIAT SGSETPGT	7212	RSC-0082	GTAEAASASGG AEGGAAALVRG GEIPGSP	7460
RSN-0083	GSAPGGPGGA ALLVRGGPAAT SGSETPGT	7213	RSC-0083	GTAEAASASGG GPGGAALLVRG GPAPGSP	7461
RSN-0084	GSAPGEAGGA AFLVRGGSIAAT GSETPGT	7214	RSC-0084	GTAEAASASGG EAGGAFLVRG GSIPGSP	7462
RSN-0085	GSAPGPGGGA ASLVRGGTAAT SGSETPGT	7215	RSC-0085	GTAEAASASGG PGGGAASLVR GGTAPGSP	7463
RSN-0086	GSAPGSEGGA ATLVRGGAIATS GSETPGT	7216	RSC-0086	GTAEAASASGG SEGGAATLVRG GAIPGSP	7464
RSN-0087	GSAPGTPGGA AGLVRGGGAAT SGSETPGT	7217	RSC-0087	GTAEAASASGG TPGGAAGLVRG GGAPGSP	7465
RSN-0088	GSAPGASGGA ADLVRGGEIAT SGSETPGT	7218	RSC-0088	GTAEAASASGG ASGGAADLVRG GEIPGSP	7466

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-0089	GSAPGGTGGA GNLVRGGPAAT SGSETPGT	7219	RSC-0089	GTAEAASASGG GTGGAGNLVR GGPAPGSP	7467
RSN-0090	GSAPGEAGGA PNLVRGGSIAT SGSETPGT	7220	RSC-0090	GTAEAASASGG EAGGAPNLVRG GSIPGSP	7468
RSN-0091	GSAPGPGGGA VNLVRGGTAAT SGSETPGT	7221	RSC-0091	GTAEAASASGG PGGGAVNLVR GGTAPGSP	7469
RSN-0092	GSAPGSEGGAL NLVRGGAIATS GSETPGT	7222	RSC-0092	GTAEAASASGG SEGGALNLVRG GAIPGSP	7470
RSN-0093	GSAPGTPGGA SNLVRGGGAAT SGSETPGT	7223	RSC-0093	GTAEAASASGG TPGGASNLVRG GGAPGSP	7471
RSN-0094	GSAPGASGGA TNLVRGGEIAT SGSETPGT	7224	RSC-0094	GTAEAASASGG ASGGATNLVRG GEIPGSP	7472
RSN-0095	GSAPGGTGGA QNLVRGGPAAT SGSETPGT	7225	RSC-0095	GTAEAASASGG GTGGAQNLVR GGPAPGSP	7473
RSN-0096	GSAPGEAGGA ENLVRGGSIAT SGSETPGT	7226	RSC-0096	GTAEAASASGG EAGGAENLVRG GSIPGSP	7474

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-1517	GSAPEAGRSAN HEPLGLVATAT SGSETPGT	7227	RSC-1517	GTAEAAASASGE AGRSANHEPLG LVATPGSP	7475
BSRS-A1-2	GSAPASGRSTN AGPSGLAGPAT SGSETPGT	7228	BSRS-A1-3	GTAEAAASASGA SGRSTNAGPS GLAGPPGSP	7476
BSRS-A2-2	GSAPASGRSTN AGPQGLAGQA TSGSETPGT	7229	BSRS-A2-3	GTAEAAASASGA SGRSTNAGPQ GLAGQPGSP	7477
BSRS-A3-2	GSAPASGRSTN AGPPGLTG PAT SGSETPGT	7230	BSRS-A3-3	GTAEAAASASGA SGRSTNAGPP GLTGPPGSP	7478
VP-1	GSAPASSRGTN AGPAGLTGPAT SGSETPGT	7231	VP-1	GTAEAAASASGA SSRGTNAGPA GLTGPPGSP	7479
RSN-1752	GSAPASSRTTN TGPSTLTGPAT SGSETPGT	7232	RSC-1752	GTAEAAASASGA SSRTTNTGPST LTGPPGSP	7480
RSN-1512	GSAPAAGRSD NGTPLELVAPA TSGSETPGT	7233	RSC-1512	GTAEAAASASGA AGRSDNGTPLE LVAPPGSP	7481
RSN-1517	GSAPEAGRSAN HEPLGLVATAT SGSETPGT	7234	RSC-1517	GTAEAAASASGE AGRSANHEPLG LVATPGSP	7482

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
VP-2	GSAPASGRGT NAGPAGLTGPA TSGSETPGT	7235	VP-2	GTAEAASASGA SGRGTNAGPA GLTGPPGSP	7483
RSN-1018	GSAPLFGRNDN HEPLELGGGAT SGSETPGT	7236	RSC-1018	GTAEAASASGL FGRNDNHEPLE LGGGPGSP	7484
RSN-1053	GSAPTAGRSDN LEPLGLVFGAT SGSETPGT	7237	RSC-1053	GTAEAASASGT AGRSDNLEPLG LVFGPGSP	7485
RSN-1059	GSAPLDGRSDN FHPPELVAGAT SGSETPGT	7238	RSC-1059	GTAEAASASGL DGRSDNFHPPE LVAGPGSP	7486
RSN-1065	GSAPLEGRSDN EEPENLVAGAT SGSETPGT	7239	RSC-1065	GTAEAASASGL EGRSDNEEPEN LVAGPGSP	7487
RSN-1167	GSAPLKGRSDN NAPLALVAGAT SGSETPGT	7240	RSC-1167	GTAEAASASGL KGRSDNNAPLA LVAGPGSP	7488
RSN-1201	GSAPVYSRGTN AGPHGLTGRAT SGSETPGT	7241	RSC-1201	GTAEAASASGV YSRGTNAGPH GLTGRPGSP	7489
RSN-1218	GSAPANRGTN KGFAGLIGPAT SGSETPGT	7242	RSC-1218	GTAEAASASGA NSRGTNKGFA GLIGPPGSP	7490

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-1226	GSAPASSRLTN EAPAGLTIPATS GSETPGT	7243	RSC-1226	GTAEAAASASGA SSRLTNEAPAG LTIPPGSP	7491
RSN-1254	GSAPDQSRGT NAGPEGLTDPA TSGSETPGT	7244	RSC-1254	GTAEAAASASGD QSRGTNAGPE GLTDPPGSP	7492
RSN-1256	GSAPESSRGTN IGQGGLTGPA SGSETPGT	7245	RSC-1256	GTAEAAASASGE SSRGTNIGQGG LTGPPGSP	7493
RSN-1261	GSAPSSSRGTN QDPAGLTIPATS GSETPGT	7246	RSC-1261	GTAEAAASASGS SSRGTNQDPA GLTIPPGSP	7494
RSN-1293	GSAPASSRGQ NHSPMGLTGPA TSGSETPGT	7247	RSC-1293	GTAEAAASASGA SSRGQNHSPM GLTGPPGSP	7495
RSN-1309	GSAPAYSRGPN AGPAGLEGRAT SGSETPGT	7248	RSC-1309	GTAEAAASASGA YSRGPNAGPA GLEGRPGSP	7496
RSN-1326	GSAPASERGN NAGPANLTGFA TSGSETPGT	7249	RSC-1326	GTAEAAASASGA SERGNNAGPA NLTGFPGSP	7497
RSN-1345	GSAPASHRGTN PKPAILTGPATS GSETPGT	7250	RSC-1345	GTAEAAASASGA SHRGTNPKPAI LTGPPGSP	7498

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-1354	GSAPMSSRRT NANPAQLTGPA TSGSETPGT	7251	RSC-1354	GTAEAASASGM SSRRTNANPAQ LTGPPGSP	7499
RSN-1426	GSAPGAGRTD NHEPLELGAAA TSGSETPGT	7252	RSC-1426	GTAEAASASGG AGRTDNHEPLE LGAAPGSP	7500
RSN-1478	GSAPLAGRSEN TAPLELTAGAT SGSETPGT	7253	RSC-1478	GTAEAASASGL AGRSENTAPLE LTAGPGSP	7501
RSN-1479	GSAPLEGRPDN HEPLALVASAT SGSETPGT	7254	RSC-1479	GTAEAASASGL EGRPDNHEPLA LVASPGSP	7502
RSN-1496	GSAPLSGRSDN EEPLALPAGAT SGSETPGT	7255	RSC-1496	GTAEAASASGL SGRSDNNEEPLA LPAGPGSP	7503
RSN-1508	GSAPEAGRTDN HEPLELSAPAT SGSETPGT	7256	RSC-1508	GTAEAASASGE AGRTDNHEPLE LSAPPGSP	7504
RSN-1513	GSAPEGGRSD NHGPLELVSGA TSGSETPGT	7257	RSC-1513	GTAEAASASGE GGRSDNHGPL ELVSGPGSP	7505
RSN-1516	GSAPLSGRSDN EAPLELEAGAT SGSETPGT	7258	RSC-1516	GTAEAASASGL SGRSDNEAPLE LEAGPGSP	7506

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-1524	GSAPLGGRAD NHEPPELGAGA TSGSETPGT	7259	RSC-1524	GTAEAASASGL GGRADNHEPP ELGAGPGSP	7507
RSN-1622	GSAPPPSRGTN AEPAGLTGEAT SGSETPGT	7260	RSC-1622	GTAEAASASGP PSRGTNAEPAG LTGEPGSP	7508
RSN-1629	GSAPASTRGEN AGPAGLEAPAT SGSETPGT	7261	RSC-1629	GTAEAASASGA STRGENAGPA GLEAPPGSP	7509
RSN-1664	GSAPESSRGTN GAPEGLTG PAT SGSETPGT	7262	RSC-1664	GTAEAASASGE SSRGTNGAPE GLTGPPGSP	7510
RSN-1667	GSAPASSRATN ESPAGLTGEAT SGSETPGT	7263	RSC-1667	GTAEAASASGA SSRATNESPAG LTGEPGSP	7511
RSN-1709	GSAPASSRGEN PPPGGLTG PAT SGSETPGT	7264	RSC-1709	GTAEAASASGA SSRGENPPPG GLTGPPGSP	7512
RSN-1712	GSAPAASRGTN TGPAELTGSAT SGSETPGT	7265	RSC-1712	GTAEAASASGA ASRGTTNTGPAE LTGSPGSP	7513
RSN-1727	GSAPAGSRTTN AGPGGLEGPAT SGSETPGT	7266	RSC-1727	GTAEAASASGA GSRTTNAGPG GLEGPPGSP	7514

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-1754	GSAPAPSRGEN AGPATLTGAAT SGSETPGT	7267	RSC-1754	GTAEAASASGA PSRGENAGPAT LTGAPGSP	7515
RSN-1819	GSAPESGRAAN TGPPTLTAPAT SGSETPGT	7268	RSC-1819	GTAEAASASGE SGRAANTGPPT LTAPPGSP	7516
RSN-1832	GSAPNPGRAA NEGPPGLPGSA TSGSETPGT	7269	RSC-1832	GTAEAASASGN PGRAANEGPP GLPGSPGSP	7517
RSN-1855	GSAPESSRAAN LTPPELTGPAT SGSETPGT	7270	RSC-1855	GTAEAASASGE SSRAANLTPPE LTGPPGSP	7518
RSN-1911	GSAPASGRAAN ETPPGLTGAAT SGSETPGT	7271	RSC-1911	GTAEAASASGA SGRAANETPPG LTGAPGSP	7519
RSN-1929	GSAPNSGRGE NLGAPGLTGTA TSGSETPGT	7272	RSC-1929	GTAEAASASGN SGRGENLGAP GLTGTPGSP	7520
RSN-1951	GSAPTTGRAAN LTPAGLTGPAT SGSETPGT	7273	RSC-1951	GTAEAASASGT TGRAANLTPAG LTGPPGSP	7521
RSN-2295	GSAPEAGRSAN HTPAGLTGPAT SGSETPGT	7274	RSC-2295	GTAEAASASGE AGRSANHTPAG LTGPPGSP	7522

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2298	GSAPESGRAAN TTPAGLTGPAT SGSETPGT	7275	RSC-2298	GTAEAASASGE SGRAANTTPAG LTGPPGSP	7523
RSN-2038	GSAPTTGRATE AANLTPAGLTG PATSGSETPGT	7276	RSC-2038	GTAEAASASGT TGRATEAANLT PAGLTGPPGSP	7524
RSN-2072	GSAPTTGRAEE AANLTPAGLTG PATSGSETPGT	7277	RSC-2072	GTAEAASASGT TGRAEEAANLT PAGLTGPPGSP	7525
RSN-2089	GSAPTTGRAGE AANLTPAGLTG PATSGSETPGT	7278	RSC-2089	GTAEAASASGT TGRAGEAANLT PAGLTGPPGSP	7526
RSN-2302	GSAPTTGRATE AANATPAGLTG PATSGSETPGT	7279	RSC-2302	GTAEAASASGT TGRATEAANAT PAGLTGPPGSP	7527
RSN-3047	GSAPTTGRAGE AEGATSAGATG PATSGSETPGT	7280	RSC-3047	GTAEAASASGT TGRAGEAEGAT SAGATGPPGSP	7528
RSN-3052	GSAPTTGEAGE AANATSAGATG PATSGSETPGT	7281	RSC-3052	GTAEAASASGT TGEAGEAANAT SAGATGPPGSP	7529
RSN-3043	GSAPTTGEAGE AAGLTPAGLTG PATSGSETPGT	7282	RSC-3043	GTAEAASASGT TGEAGEAAGLT PAGLTGPPGSP	7530

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-3041	GSAPTTGAAGE AANATPAGLTG PATSGSETPGT	7283	RSC-3041	GTAEAAASASGT TGAAGEAANAT PAGLTGPPGSP	7531
RSN-3044	GSAPTTGRAGE AAGLTPAGLTG PATSGSETPGT	7284	RSC-3044	GTAEAAASASGT TGRAGEAAGLT PAGLTGPPGSP	7532
RSN-3057	GSAPTTGRAGE AANATSAGATG PATSGSETPGT	7285	RSC-3057	GTAEAAASASGT TGRAGEAANAT SAGATGPPGSP	7533
RSN-3058	GSAPTTGEAGE AAGATSAGATG PATSGSETPGT	7286	RSC-3058	GTAEAAASASGT TGEAGEAAGAT SAGATGPPGSP	7534
RSN-2485	GSAPESGRAAN TEPPELGAGAT SGSETPGT	7287	RSC-2485	GTAEAAASASGE SGRAANTEPPE LGAGPGSP	7535
RSN-2486	GSAPESGRAAN TAPEGLTG PAT SGSETPGT	7288	RSC-2486	GTAEAAASASGE SGRAANTAPEG LTGPPGSP	7536
RSN-2488	GSAPEPGRAAN HEPSGLTEGAT SGSETPGT	7289	RSC-2488	GTAEAAASASGE PGRAANHEPS GLTEGPGSP	7537
RSN-2599	GSAPESGRAAN HTGAPPGGLTG PATSGSETPGT	7290	RSC-2599	GTAEAAASASGE SGRAANHTGAP PGGLTGPPGSP	7538

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2706	GSAPTTGRTGE GANATPGGLTG PATSGSETPGT	7291	RSC-2706	GTAEAASASGT TGRTGEGANAT PGGLTGPPGSP	7539
RSN-2707	GSAPRTGRSG EAANETPEGLE GPATSGSETPGT	7292	RSC-2707	GTAEAASASGR TGRSGEAANET PEGLEGPPGSP	7540
RSN-2708	GSAPRTGRTGE SANETPAGLGG PATSGSETPGT	7293	RSC-2708	GTAEAASASGR TGRTGESANET PAGLGGPPGSP	7541
RSN-2709	GSAPSTGRTGE PANETPAGLSG PATSGSETPGT	7294	RSC-2709	GTAEAASASGS TGRTGEPANET PAGLSGPPGSP	7542
RSN-2710	GSAPTTGRAGE PANATPTGLSG PATSGSETPGT	7295	RSC-2710	GTAEAASASGT TGRAGEPANAT PTGLSGPPGSP	7543
RSN-2711	GSAPRTGRPG EGANATPTGLP GPATSGSETPGT	7296	RSC-2711	GTAEAASASGR TGRPGEGANAT PTGLPGPPGSP	7544
RSN-2712	GSAPRTGRGG EAANATPSGLG GPATSGSETPGT	7297	RSC-2712	GTAEAASASGR TGRGGEAANAT PSGLGGPPGSP	7545

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2713	GSAPSTGRSGE SANATPGGLGG PATSGSETPGT	7298	RSC-2713	GTAEAASASGS TGRSGESANAT PGGLGGPPGS P	7546
RSN-2714	GSAPRTGRTGE EANATPAGLPG PATSGSETPGT	7299	RSC-2714	GTAEAASASGR TGRTGEEANAT PAGLPGPPGSP	7547
RSN-2715	GSAPATGRPGE PANTTPEGLEG PATSGSETPGT	7300	RSC-2715	GTAEAASASGA TGRPGE PANTT PEGLEGPPGSP	7548
RSN-2716	GSAPSTGRSGE PANATPGGLTG PATSGSETPGT	7301	RSC-2716	GTAEAASASGS TGRSGEPANAT PGGLTGPPGSP	7549
RSN-2717	GSAPPTGRGG EGANTTPTGLP GPATSGSETPG T	7302	RSC-2717	GTAEAASASGP TGRGGEGANT TPTGLPGPPGS P	7550
RSN-2718	GSAPPTGRSGE GANATPSGLTG PATSGSETPGT	7303	RSC-2718	GTAEAASASGP TGRSGEGANAT PSGLTGPPGSP	7551
RSN-2719	GSAPTTGRASE GANSTPAPLTE PATSGSETPGT	7304	RSC-2719	GTAEAASASGT TGRASEGANST PAPLTEPPGSP	7552

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2720	GSAPTYGRAAE AANTTPAGLTA PATSGSETPGT	7305	RSC-2720	GTAEAAASASGT YGRAAEAAANTT PAGLTAPPGSP	7553
RSN-2721	GSAPTTGRATE GANATPAELTE PATSGSETPGT	7306	RSC-2721	GTAEAAASASGT TGRATEGANAT PAELTEPPGSP	7554
RSN-2722	GSAPTVGRASE EANTTPASLTG PATSGSETPGT	7307	RSC-2722	GTAEAAASASGT VGRASEEANTT PASLTGPPGSP	7555
RSN-2723	GSAPTTGRAPE AANATPAPLTG PATSGSETPGT	7308	RSC-2723	GTAEAAASASGT TGRAPEAANAT PAPLTGPPGSP	7556
RSN-2724	GSAPTWGRAT EPANATPAPLT SPATSGSETPG T	7309	RSC-2724	GTAEAAASASGT WGRATEPANA TPAPLTSPPGS P	7557
RSN-2725	GSAPTVGRASE SANATPAELTS PATSGSETPGT	7310	RSC-2725	GTAEAAASASGT VGRASESANAT PAELTSPPGSP	7558
RSN-2726	GSAPTVGRAPE GANSTPAGLTG PATSGSETPGT	7311	RSC-2726	GTAEAAASASGT VGRAPEGANST PAGLTGPPGSP	7559
RSN-2727	GSAPTWGRAT EAPNLEPATLTT PATSGSETPGT	7312	RSC-2727	GTAEAAASASGT WGRATEAPNLE PATLTTPPGSP	7560

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2728	GSAPTTGRATE APNLTPAPLTE PATSGSETPGT	7313	RSC-2728	GTAEAAASASGT TGRATEAPNLT PAPLTEPPGSP	7561
RSN-2729	GSAPTQGRATE APNLSPAALTS PATSGSETPGT	7314	RSC-2729	GTAEAAASASGT QGRATEAPNLS PAALTSPPGSP	7562
RSN-2730	GSAPTQGRAAE APNLTPATLTAP ATSGSETPGT	7315	RSC-2730	GTAEAAASASGT QGRAAEAPNLT PATLTAPPGSP	7563
RSN-2731	GSAPTSGRAPE ATNLAPAPLTG PATSGSETPGT	7316	RSC-2731	GTAEAAASASGT SGRAPEATNLA PAPLTGPPGSP	7564
RSN-2732	GSAPTQGRAAE AANLTPAGLTE PATSGSETPGT	7317	RSC-2732	GTAEAAASASGT QGRAAEAAANT PAGLTEPPGSP	7565
RSN-2733	GSAPTTGRAGS APNLPPTGLTT PATSGSETPGT	7318	RSC-2733	GTAEAAASASGT TGRAGSAPNLP PTGLTTPPGSP	7566
RSN-2734	GSAPTTGRAG GAENLPPEGLT APATSGSETPG T	7319	RSC-2734	GTAEAAASASGT TGRAGGAENLP PEGLTAPPGSP	7567
RSN-2735	GSAPTTSRAGT ATNLTPEGLTA PATSGSETPGT	7320	RSC-2735	GTAEAAASASGT TSRAGTATNLT PEGLTAPPGSP	7568

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2736	GSAPTTGRAGT ATNLPPSGLTT PATSGSETPGT	7321	RSC-2736	GTAEAASASGT TGRAGTATNLP PSGLTTPPGSP	7569
RSN-2737	GSAPTTARAGE AENLSPSGLTA PATSGSETPGT	7322	RSC-2737	GTAEAASASGT TARAGEAENLS PSGLTAPPGSP	7570
RSN-2738	GSAPTTGRAG GAGNLAPGGLT EPATSGSETPG T	7323	RSC-2738	GTAEAASASGT TGRAGGAGNL APGGLTEPPGS P	7571
RSN-2739	GSAPTTGRAGT ATNLPPEGLTG PATSGSETPGT	7324	RSC-2739	GTAEAASASGT TGRAGTATNLP PEGLTGPPGSP	7572
RSN-2740	GSAPTTGRAG GAANLAPTGLT EPATSGSETPG T	7325	RSC-2740	GTAEAASASGT TGRAGGAANLA PTGLTEPPGSP	7573
RSN-2741	GSAPTTGRAGT AENLAPSGLTT PATSGSETPGT	7326	RSC-2741	GTAEAASASGT TGRAGTAENLA PSGLTTPPGSP	7574
RSN-2742	GSAPTTGRAGS ATNLGPGGLTG PATSGSETPGT	7327	RSC-2742	GTAEAASASGT TGRAGSATNLG PGGLTGPPGSP	7575

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2743	GSAPTTARAGG AENLTPAGLTE PATSGSETPGT	7328	RSC-2743	GTAEAASASGT TARAGGAENLT PAGLTEPPGSP	7576
RSN-2744	GSAPTTARAGS AENLSPSGLTG PATSGSETPGT	7329	RSC-2744	GTAEAASASGT TARAGSAENLS PSGLTGPPGSP	7577
RSN-2745	GSAPTTARAGG AGNLAPEGLTT PATSGSETPGT	7330	RSC-2745	GTAEAASASGT TARAGGAGNLA PEGLTTPPGSP	7578
RSN-2746	GSAPTTSRAGA AENLPTGLTG PATSGSETPGT	7331	RSC-2746	GTAEAASASGT TSRAGAAENLT PTGLTGPPGSP	7579
RSN-2747	GSAPTYGRTTT PGNEPPASLEA EATSGSETPGT	7332	RSC-2747	GTAEAASASGT YGRTTTTPGNEP PASLEAEPGSP	7580
RSN-2748	GSAPTYSRGES GPNEPPPGLTG PATSGSETPGT	7333	RSC-2748	GTAEAASASGT YSRGESGPNEP PPGLTGPPGSP	7581
RSN-2749	GSAPAWGRTG ASENETPAPLG GEATSGSETPG T	7334	RSC-2749	GTAEAASASGA WGRTGASENE TPAPLGGEPGS P	7582
RSN-2750	GSAPRWGRAE TTPNTPPEGLE	7335	RSC-2750	GTAEAASASGR WGRAETTPNTP PEGLETEPGSP	7583

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
	TEATSGSETPG T				
RSN-2751	GSAPESGRAAN HTGAEPPELGA GATSGSETPGT	7336	RSC-2751	GTAEAAASASGE SGRAANHTGAE PPELGAGPGSP	7584
RSN-2754	GSAPTTGRAGE AANLTPAGLTE SATSGSETPGT	7337	RSC-2754	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PAGLTESPGSP	7585
RSN-2755	GSAPTTGRAGE AANLTPAALTE SATSGSETPGT	7338	RSC-2755	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PAALTESPGSP	7586
RSN-2756	GSAPTTGRAGE AANLTPAPLTE SATSGSETPGT	7339	RSC-2756	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PAPLTESPGSP	7587
RSN-2757	GSAPTTGRAGE AANLTPEPLTE SATSGSETPGT	7340	RSC-2757	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PEPLTESPGSP	7588
RSN-2758	GSAPTTGRAGE AANLTPAGLTG AATSGSETPGT	7341	RSC-2758	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PAGLTGAPGSP	7589
RSN-2759	GSAPTTGRAGE AANLTPEGLTG AATSGSETPGT	7342	RSC-2759	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PEGLTGAPGSP	7590

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2760	GSAPTTGRAGE AANLTPEPLTG AATSGSETPGT	7343	RSC-2760	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PEPLTGAPGSP	7591
RSN-2761	GSAPTTGRAGE AANLTPAGLTE AATSGSETPGT	7344	RSC-2761	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PAGLTEAPGSP	7592
RSN-2762	GSAPTTGRAGE AANLTPEGLTE AATSGSETPGT	7345	RSC-2762	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PEGLTEAPGSP	7593
RSN-2763	GSAPTTGRAGE AANLTPAPLTE AATSGSETPGT	7346	RSC-2763	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PAPLTEAPGSP	7594
RSN-2764	GSAPTTGRAGE AANLTPEPLTE AATSGSETPGT	7347	RSC-2764	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PEPLTEAPGSP	7595
RSN-2765	GSAPTTGRAGE AANLTPEPLTG PATSGSETPGT	7348	RSC-2765	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PEPLTGPPGSP	7596
RSN-2766	GSAPTTGRAGE AANLTPAGLTG GATSGSETPGT	7349	RSC-2766	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PAGLTGGPGSP	7597
RSN-2767	GSAPTTGRAGE AANLTPEGLTG GATSGSETPGT	7350	RSC-2767	GTAEAAASASGT TGRAGEAANLT PEGLTGGPGSP	7598

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-2768	GSAPTTGRAGE AANLTPEALTG GATSGSETPGT	7351	RSC-2768	GTAEAASASGT TGRAGEAANLT PEALTGGPGSP	7599
RSN-2769	GSAPTTGRAGE AANLTPEPLTG GATSGSETPGT	7352	RSC-2769	GTAEAASASGT TGRAGEAANLT PEPLTGGPGSP	7600
RSN-2770	GSAPTTGRAGE AANLTPAGLTE GATSGSETPGT	7353	RSC-2770	GTAEAASASGT TGRAGEAANLT PAGLTEGPGSP	7601
RSN-2771	GSAPTTGRAGE AANLTPEGLTE GATSGSETPGT	7354	RSC-2771	GTAEAASASGT TGRAGEAANLT PEGLTEGPGSP	7602
RSN-2772	GSAPTTGRAGE AANLTPAPLTE GATSGSETPGT	7355	RSC-2772	GTAEAASASGT TGRAGEAANLT PAPLTEGPGSP	7603
RSN-2773	GSAPTTGRAGE AANLTPEPLTE GATSGSETPGT	7356	RSC-2773	GTAEAASASGT TGRAGEAANLT PEPLTEGPGSP	7604
RSN-3047	GSAPTTGRAGE AEGATSAGATG PATSGSETPGT	7357	RSC-3047	GTAEAASASGT TGRAGEAEGAT SAGATGPPGSP	7605
RSN-2783	GSAPEAGRSAE ATSAGATGPAT SGSETPGT	7358	RSC-2783	GTAEAASASGE AGRSAEATSAG ATGPPGSP	7606

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-3107	GSAPSASGTYS RGESGPGSPAT SGSETPGT	7359	RSC-3107	GTAEAASASGS ASGTYSRGESG PGSPPGSP	7607
RSN-3103	GSAPSASGEAG RTDTHPGSPAT SGSETPGT	7360	RSC-3103	GTAEAASASGS ASGEAGRTDTH PGSPPGSP	7608
RSN-3102	GSAPSASGEPG RAAEHPGSPAT SGSETPGT	7361	RSC-3102	GTAEAASASGS ASGEPGRAAEH PGSPPGSP	7609
RSN-3119	GSAPSPAGESS RGTTIAGSPAT SGSETPGT	7362	RSC-3119	GTAEAASASGS PAGESSRGTTI AGSPPGSP	7610
RSN-3043	GSAPTTGEAGE AAGLTPAGLTG PATSGSETPGT	7363	RSC-3043	GTAEAASASGT TGEAGEAAGLT PAGLTGPPGSP	7611
RSN-2789	GSAPEAGESAG ATPAGLTGPAT SGSETPGT	7364	RSC-2789	GTAEAASASGE AGESAGATPAG LTGPPGSP	7612
RSN-3109	GSAPSASGAPL ELEAGPGSPAT SGSETPGT	7365	RSC-3109	GTAEAASASGS ASGAPLELEAG PGSPPGSP	7613
RSN-3110	GSAPSASGEPP ELGAGPGSPAT SGSETPGT	7366	RSC-3110	GTAEAASASGS ASGEPPELGAG PGSPPGSP	7614

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-3111	GSAPSASGEPS GLTEPGSPAT SGSETPGT	7367	RSC-3111	GTAEAASASGS ASGEPSGLTEG PGSPPGSP	7615
RSN-3112	GSAPSASGTPA PLTEPPGSPAT SGSETPGT	7368	RSC-3112	GTAEAASASGS ASGTPAPLTEP PGSPPGSP	7616
RSN-3113	GSAPSASGTPA ELTEPPGSPAT SGSETPGT	7369	RSC-3113	GTAEAASASGS ASGTPAELTEP PGSPPGSP	7617
RSN-3114	GSAPSASGPPP GLTGPPGSPAT SGSETPGT	7370	RSC-3114	GTAEAASASGS ASGPPPGLTGP PGSPPGSP	7618
RSN-3115	GSAPSASGTPA PLGGEPGSPAT SGSETPGT	7371	RSC-3115	GTAEAASASGS ASGTPAPLGGE PGSPPGSP	7619
RSN-3125	GSAPSPAGAPE GLTGPA GSPAT SGSETPGT	7372	RSC-3125	GTAEAASASGS PAGAPEGLTGP AGSPPGSP	7620
RSN-3126	GSAPSPAGPPE GLETEAGSPAT SGSETPGT	7373	RSC-3126	GTAEAASASGS PAGPPEGLETE AGSPPGSP	7621
RSN-3127	GSAPSPTSGQ GGLTGPGSEPA TSGSETPGT	7374	RSC-3127	GTAEAASASGS PTSGQGGLTGP GSEPPGSP	7622

Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:	Nombre	Secuencia de aminoácidos	Sec. con núm. de ident.:
RSN-3131	GSAPSESAPPE GLETESTEPAT SGSETPGT	7375	RSC-3131	GTAEAASASGS ESAPPEGLETE STEPPGSP	7623
RSN-3132	GSAPSEGSEPL ELGAASETPAT SGSETPGT	7376	RSC-3132	GTAEAASASGS EGSEPLELGAA SETPPGSP	7624
RSN-3133	GSAPSEGSGPA GLEAPSETPAT SGSETPGT	7377	RSC-3133	GTAEAASASGS EGSGPAGLEAP SETPPGSP	7625
RSN-3138	GSAPSEPTPPA SLEAEPGSPAT SGSETPGT	7378	RSC-3138	GTAEAASASGS EPTPPASLEAE PGSPPGSP	7626

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende un RS1 y un RS2 que tienen diferentes tasas de escisión y diferentes eficiencias de escisión a múltiples proteasas para las que son sustratos. Como una proteasa dada se puede encontrar en diferentes concentraciones en un tumor, en comparación con tejidos sanos o en circulación, la descripción proporciona RS que tienen una eficiencia de escisión mayor o menor para una proteasa dada con el fin de asegurar que una proteína de fusión se convierte preferentemente de la forma inactiva a la forma activa (es decir, por la separación y liberación de las citocinas y ELNN de la proteína de fusión después de la escisión de las RS) cuando esté en proximidad a la célula o tejido canceroso y sus proteasas colocalizadas en comparación con la tasa de escisión de las RS en tejido sano o la circulación tal que la citocina liberada de las proteínas de fusión tienen una mayor capacidad para unirse a ligandos en el tumor en comparación con la forma inactiva que permanece en circulación.

Mediante tales diseños selectivos, el índice terapéutico de las composiciones resultantes puede mejorarse, dando como resultado efectos secundarios reducidos en relación con las terapias de convención que no incorporan tal activación específica del sitio.

En algunas modalidades, la eficiencia de escisión es el valor $\log_2$ de la relación del porcentaje del sustrato de prueba que comprende el RS escindido al porcentaje del sustrato de control AC1611 escindido cuando cada uno se somete a la enzima proteasa en ensayos bioquímicos en los que se realiza la reacción en donde la concentración inicial de sustrato es de 6 μM , las reacciones se incuban a 37 °C durante 2 horas antes de detenerse añadiendo EDTA, con la cantidad de productos de digestión y sustrato no escindido analizados por SDS-PAGE no reductor para establecer la relación del porcentaje escindido.

La eficiencia de escisión se puede calcular de la siguiente manera:

$\text{Log}_2 \left(\frac{\% \text{ escindido para sustrato de interés}}{\% \text{ escindido para AC1611 en el mismo experimento}} \right)$. Por lo tanto, una eficiencia de escisión

de -1 significa que la cantidad de sustrato de prueba escindido fue de 50 % en comparación con la del sustrato de control, mientras que una eficiencia de escisión de +1 significa que la cantidad de sustrato de prueba escindido fue de 200 % en comparación con la del sustrato de control. Una mayor tasa de escisión por la proteasa de prueba en relación con el control daría como resultado una mayor eficiencia de escisión, y una tasa más lenta de escisión por la proteasa de prueba en relación con el control daría como resultado una menor eficiencia de escisión. Se estableció una secuencia de RS de control AC1611 (RSR-

1517), que tiene la secuencia de aminoácidos EAGRSANHEPLGLVAT (sec. con núm. de ident.: 7001), que tiene una eficiencia de escisión basal apropiada por las proteasas legumaína, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA, y matriptasa, cuando se probaron en ensayos bioquímicos *in vitro* para tasas de escisión por las proteasas individuales. Por sustitución selectiva de aminoácidos en ubicaciones individuales en los péptidos de RS, se crearon genotecas de RS y se evaluaron contra el panel de las 7 proteasas, que dieron como resultado perfiles que se usaron para establecer pautas para sustituciones apropiadas de aminoácidos para lograr RS con eficiencias de escisión deseadas. En

algunas modalidades, al hacer RS con eficiencias de escisión deseadas, se prefieren sustituciones que usan los aminoácidos hidrófilos A, E, G, P, S y T, sin embargo otros L-aminoácidos pueden sustituirse en posiciones dadas con el fin de ajustar la eficiencia de escisión siempre que los RS retengan al menos alguna susceptibilidad a la escisión por una proteasa dada. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos en un péptido para retener o efectuar la actividad están dentro del conocimiento y las capacidades de un experto en la técnica. En algunas modalidades, la descripción proporciona un RS en el que el RS se escinde por una proteasa que incluye, pero no se limita a, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA o matriptasa (también conocida como MT-SP1) con al menos 0,2 log₂, o 0,4 log₂, o 0,8 log₂, o 1,0 log₂ mayor eficiencia de escisión en un ensayo bioquímico competitivo *in vitro* en comparación con la escisión por la misma proteasa de una secuencia de control RSR-1517 que tiene la secuencia EAGRSANHEPLGLVAT (sec. con núm. de ident.: 7001). En algunas modalidades, la descripción proporciona un RS en el que el RS se escinde por una proteasa que incluye, pero no se limita a, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-11, uPA o matriptasa con al menos 0,2 log₂, o 0,4 log₂, o 0,8 log₂, o 1,0 log₂ menor eficiencia de escisión en un ensayo bioquímico competitivo *in vitro* en comparación con la escisión por la misma proteasa de una secuencia de control RSR-1517 que tiene la secuencia EAGRSANHEPLGLVAT (sec. con núm. de ident.: 7001). En algunas modalidades, la descripción proporciona un RS en el que la tasa de escisión del RS por una proteasa que incluye, pero no se limita a, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA o matriptasa es al menos 2 veces, o al menos 4 veces, o al menos 8 veces, o al menos 16 veces más rápida en comparación con la secuencia de control RSR-1517 que tiene la secuencia EAGRSANHEPLGLVAT (sec. con núm. de ident.: 7001). En algunas modalidades, la descripción proporciona un RS en el que la tasa de escisión del RS por una proteasa que incluye, pero no se limita a, MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-14, uPA o matriptasa es al menos 2 veces, o al menos 4 veces, o al menos 8 veces, o al menos 16

veces más lenta en comparación con la secuencia de control RSR-1517 que tiene la secuencia EAGRSANHEPLGLVAT (sec. con núm. de ident.: 7001).

En algunas modalidades, el RS comprende la secuencia de aminoácidos EAGRSAXHTPAGLTGP (sec. con núm. de ident.: 7627), en la que X es cualquier

aminoácido distinto de N. En algunas modalidades, X es S. En algunas modalidades, X es T. En algunas modalidades, X es Y. En algunas modalidades, X es Q. En algunas modalidades, X es G. En algunas modalidades, X es A. En algunas modalidades, X es V. En algunas modalidades, X es C. En algunas modalidades, X es P. En algunas modalidades, X es L. En algunas modalidades, X es I. En algunas modalidades, X es M.

En algunas modalidades, X es F. En algunas modalidades, X es K. En algunas modalidades, X es R. En algunas modalidades, X es H. En algunas modalidades, X es D. En algunas modalidades, X es E. En algunas modalidades, el RS no está escindido por legumaínas. En algunas modalidades, el RS no es escindible por legumaína en sangre, plasma o suero humanos. Ventajosamente, la secuencia de aminoácidos RS EAGRSAXHTPAGLTGP (sec. con núm. de ident.: 7627), en donde X es cualquier aminoácido distinto de N, elimina un sitio de glicosilación en la secuencia. La eliminación de dicho sitio de glicosilación puede mejorar la accesibilidad del sitio de liberación sobre el que actuará la proteasa asociada tumoral. La eliminación de dicho sitio de glicosilación puede mejorar la expresión de la proteína de fusión que alberga dicha secuencia de RS.

En algunas modalidades, el RS no es escindible después de la incubación con aproximadamente 1 nM o menos legumaína durante aproximadamente 20 horas. En algunas modalidades, el RS se escinde por legumaína menos rápida o eficientemente que RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; sec. con núm. de ident.:7048) se escinde por legumaína. En algunas modalidades, el RS se escinde por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 50 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; sec. con núm. de ident.: 7048). En algunas modalidades, el RS es escindido por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 25 % de la

tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295. En algunas modalidades, el RS es escindido por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 10 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295. En algunas modalidades, el RS es escindido por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 5 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295. En algunas modalidades, el RS es escindido por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 2,5 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295.

En algunas modalidades, el RS se escinde por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 50 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295 (EAGRSANHTPAGLTGP; sec. con núm. de ident.:7048) en plasma humano. En algunas modalidades, el RS es escindido por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 25 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295 en plasma humano. En algunas modalidades, el RS es escindido por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 10 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295 en plasma humano. En algunas modalidades, el RS es escindido por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 5 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295 en plasma humano. En algunas modalidades, el RS es escindido por la legumaína a una tasa que es menor que aproximadamente 2,5 % de la tasa a la que la legumaína escinde RSR-2295 en plasma humano.

En algunas modalidades, la descripción proporciona proteínas de fusión que comprenden múltiples RS en las que cada secuencia de RS se identifica en la presente por el grupo de secuencias establecido en la Tabla 6a y los RS se unen entre sí por 1 a 6 aminoácidos que son glicina, serina, alanina y treonina. En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende un primer RS y un segundo RS diferentes del primer RS en donde cada secuencia de RS se identifica en la presente por una secuencia establecida en la Tabla 6a y los RS se unen entre sí por 1 a 6 aminoácidos que son glicina, serina, alanina, y treonina. En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende un primer RS, un segundo RS

diferente del primer RS, y un tercer RS diferente del primer y el segundo RS en donde cada
 secuencia se identifica en la presente por una secuencia establecida en la Tabla 6a y el
 primer y el segundo y el tercer RS se unen entre sí por 1 a 6 aminoácidos que son glicina,
 serina, alanina, y treonina. En algunas modalidades, se pueden concatenar múltiples RS
 5 de la proteína de fusión para formar una secuencia que puede escindirse por múltiples
 proteasas a diferentes tasas o eficiencia de escisión. En algunas modalidades, la
 descripción proporciona una proteína de fusión que comprende un RS1 y un RS2, en donde
 cada uno tiene una secuencia establecida en la Tabla 6a o 6b y ELNNN (p. ej., un ELNN1
 y ELNN2), tales como las descritas en la presente, en donde el RS1 se fusiona entre el
 10 ELNN1 y las citocinas y el RS2 se fusiona entre el ELNN2 y las citocinas. En algunas
 modalidades, una proteína de fusión se escinde más fácilmente en tejidos diana que
 expresan múltiples proteasas (p. ej., tejidos tumorales), en comparación con tejidos sanos
 o cuando están en la circulación normal, con el resultado de que los fragmentos resultantes
 que llevan las citocinas penetrarían más fácilmente en el tejido diana; p. ej., un tumor, y
 15 tienen una capacidad mejorada para unirse y unir la célula cancerosa y la célula efectora.
 En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende un primer segmento de
 liberación (RS1) que se posiciona entre un primer ELNN y una citocina. En algunas
 modalidades, el polipéptido comprende además un segundo segmento de liberación (RS2)
 que se posiciona entre la citocina y un segundo ELNN. En algunas modalidades, RS1 y
 20 RS2 son idénticos en secuencia. En algunas modalidades, RS1 y RS2 no son idénticos en
 secuencia. En algunas modalidades, el RS1 comprende una secuencia de aminoácidos
 que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o
 100 % de identidad de secuencia con una secuencia identificada en la presente en la Tabla
 6a o 6b o un subconjunto de esta. En algunas modalidades, el RS2 comprende una
 25 secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %,
 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con una secuencia identificada
 en la presente en la Tabla 6a o 6b o un subconjunto de esta. En algunas modalidades, RS1

y RS2 son cada uno un sustrato para la escisión por múltiples proteasas en uno, dos o tres sitios de escisión dentro de cada secuencia de segmento de liberación.

En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende además uno o más fragmentos de referencia (p. ej., fragmentos de código de barras) liberables de la proteína de fusión tras la digestión por la proteasa. En algunas modalidades, el uno o más fragmentos de referencia es un único fragmento de referencia que difiere en secuencia y peso molecular de todos los demás fragmentos peptídicos que son liberables del polipéptido tras la digestión del polipéptido por la proteasa.

10 Proteínas de fusión ilustrativas

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 80 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en la Tabla A1 y la Tabla A2 (sec. con núms. de ident.: 1000-1042) o un subconjunto de estas. En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1000-1042 o un subconjunto de estas. En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente)

- 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 % o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1000-1042 o un subconjunto de estas. En algunas modalidades, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1000-1042.
- 10 En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1000, y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos

(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
 (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
 5 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
 secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1033.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de
 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

10 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 15 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
 (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una

20 secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1001, y una segunda subunidad de
 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 25 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos

(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
(aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
(aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
5 secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1033.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de
polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

(aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
(aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
10 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
(aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
(aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
15 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
(aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1002, y una segunda subunidad de

polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
20 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
(aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
(aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
(aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
25 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
(aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos

(aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1033.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de

5 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
10 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
15 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1003, y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
20 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
25 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos

(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1034.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

- 5 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
(aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
(aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
(aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
10 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
(aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
(aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
15 secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1004, y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
(aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
(aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
(aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
20 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
(aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
(aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
25 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1035.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una

secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1005, y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1036.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

(aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
 5 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
 (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
 10 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
 secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1000, y una segunda subunidad de
 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
 15 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
 (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
 20 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
 cualquiera de la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1033-1036.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de
 25 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos

(aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
 5 (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
 secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1001, y una segunda subunidad de
 10 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
 15 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
 (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
 20 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
 cualquiera de la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1033-1036.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de
 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 25 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos

- (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
 (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
 5 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
 secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1002, y una segunda subunidad de
 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 10 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
 15 (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
 (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
 cualquiera de la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1033-1036.
 20 En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de
 polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
 (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
 25 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
 (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos

(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
(aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
(aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una

5 secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1003, y una segunda subunidad de
polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos
(aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
(aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
(aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
10 (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
(aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
(aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
15 (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
cualquiera de la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1033-1036.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de
polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

20 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
(aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
(aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
(aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
25 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
(aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos

(aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1004, y una segunda subunidad de
polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

5 (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
(aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
(aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
(aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
10 (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
(aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
(aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una
15 cualquiera de la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1033-1036.

En algunas modalidades, una proteína de fusión comprende una primera subunidad de
polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos

(aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos
(aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos
20 (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos
(aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos
(aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos
(aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos
(aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos
25 (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos
(aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos
(aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una

secuencia establecida en la sec. con núm. de ident.: 1005, y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos (aproximadamente) 81 %, al menos (aproximadamente) 82 %, al menos (aproximadamente) 83 %, al menos (aproximadamente) 84 %, al menos (aproximadamente) 85 %, al menos (aproximadamente) 86 %, al menos (aproximadamente) 87 %, al menos (aproximadamente) 88 %, al menos (aproximadamente) 89 %, al menos (aproximadamente) 90 %, al menos (aproximadamente) 91 %, al menos (aproximadamente) 92 %, al menos (aproximadamente) 93 %, al menos (aproximadamente) 94 %, al menos (aproximadamente) 95 %, al menos (aproximadamente) 96 %, al menos (aproximadamente) 97 %, al menos (aproximadamente) 98 %, al menos (aproximadamente) 99 %, o (aproximadamente) 100 % de identidad de secuencia con una cualquiera de la secuencia establecida en las sec. con núms. de ident.: 1033-1036.

Se contempla específicamente que las composiciones de esta descripción puedan comprender variantes de secuencia de las secuencias de aminoácidos establecidas en la Tabla A, tales como con secuencia(s) enlazadora(s) sustituida(s) o insertada(s) o con secuencia(s) etiquetada(s) de purificación unidas a las mismas, siempre que las variantes exhiban bioactividad/bioactividades y/o mecanismos de activación sustancialmente similares o iguales.

Tabla A1: Secuencias de aminoácidos ilustrativas de polipéptidos p35 de IL-12

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1000	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
(P72H Sub35)	PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATEAGRSASHTPAGLTGPG TPESATPESRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKAR QTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK IKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTATPESAPEAGRSASHTP AGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA
1001 (P73H Sub35)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATEAGRSASHTPAGLTGPG TPESATPESRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKAR QTLEFY PCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK IKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLSSAGTATPESAPEAGRSASHTP AGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA
1002 (P74H Sub35)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATEAGRSASHTPAGLTGPG TPESATPESRNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSNMLQKAR QTLEFYPC TSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRET SFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLLM DPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTK IKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLQASGTATPESAPEAGRSASHTP AGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA
1003 (P31H Sub35)	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSES ATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPEAGRSAS HTPAGLTGPGTPESATPESRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRA VSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTK NESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTATPESSP GEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATGEPEA
1004 (P27H Sub35)	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSES ATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPEAGRSAS HTPAGLTGPGTPESATPESRNLPVATPDPGMFPCLLHHSQNLLRA VSNMLQKARQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTK

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	NESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTATPESSP GEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATGEPEA
1005 (P25H Sub35)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGP GTPESATPESRNLPVATPDPMFPCLHHSQNLLRAVSNMLQKA RQTLEFYPTCTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTKNESCLNSRE TSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVEFKTMNAKLL MDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYK TKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTATPESSPGEAGRSAS HTPAGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG GSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPES

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA
1006 (P01H Sub35)	HHHHHHHHGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPEAGRSANH TPAGLTGPGTAEAASASGRNLPVATPDPGMFPCLHHSQNLLRA VSNMLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKTSTVEACLPLELTK NESCLNSRETSFITNGSCLASRKTSFMMALCLSSIEDLKMYQVE FKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDELMQALNFNSETVPQKS SLEEPDFYKTKIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNASGTAEAASAS G
1007 (P71M Sub35)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATEAGRSASHTPAGLTGPG TPESATPESRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKCLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTR GSCLPPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQ QIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKL

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	CILLHAFSTRVVTINRVMGYLNASGTATPESAPEAGRSASHTPAG LTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA
1008 (P70M Sub35)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATEAGRSASHTPAGLTGPG TPESATPESRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLKH YSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTTR GSCLPPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNHQ QIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMKL CILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGTATPESAPEAGRSASHTPAG LTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGPGSE

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA
1009 (P30M Sub35)	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSES ATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPEAGRSAS HTPAGLTGPGTPESATPESRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTDDM VKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCL ATRETSSTTRGSCCLPPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAIN AALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEA DPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGTATPESSPGEA GRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TGEPEA
1030 (P26M Sub35)	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSES ATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPEAGRSAS HTPAGLTGPGTPESATPESRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTDDM VKTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCL ATRETSSTTRGSCCLPPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAIN

Sec. con número de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	AALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEA DPYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGTATPESSPGEA GRSASHTPAGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TGEPEA
1031 (P24M Sub35)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPGTSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGP GTPESATPESRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTTDDMVKTAREKLK HYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLATRETSSTT RGSCLPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINAALQNHNH QQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEADPYRVKMK LCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGTATPESSPGEAGRSASHTP AGLTGPATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSASATPESGP

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGEPEA
1032 (P01M Sub35)	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPEAGRSANHTPAGLTGPG TAEAASASGMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEED DITWTSQDRHGVIGSGKLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSH LLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVRN MDLKFNKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLQDRDYEKYSVS CQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPP KNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKE KMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYNS SCSKWACVPCRVRSGTAEAASASGEAGRSANHTPAGLTGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

Tabla A2: Secuencias de aminoácidos ilustrativas de polipéptidos p40 de IL-12

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1033 (P72H/ P73H/P74H Sub40)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATEAGRSASHTPAGLTGPTS ESATPESIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGIT WTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLL LHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWLTTI STDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVVRGDNKEYEYSV ECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPD PKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQGK SKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSEWAS VPCSGTATPESGPGSEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAG

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1034 (P31H Sub40)	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSES ATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPEAGRSAS HTPAGLTGPTSESATPESIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYS GRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS SFFIRDIIPDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGPSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT
1035 (P27H Sub40)	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSES ATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPEAGRSAS HTPAGLTGPTSESATPESIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVL TCDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTCHK GGEVLSHSLLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYS GRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVR GDNKEYEYSVEQCEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTS

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	SFFIRDIKPDPPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFS LTFCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRY YSSSWSEWASVPCSGTATPESGPGGEAGRSASHTPAGLTGPATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT SPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET
1036 (P25H Sub40)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPT SESATPESIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEEDGI TWLTDQSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYCHKKGGEVLSHSL LLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWWT TISTDLTFSVKSSRGSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIKPD PPKLNQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQVQG KSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYSSSWSEWA SVPCSGTATPESGPGGEAGRSASHTPAGLTGPATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAG
1037 (P01H Sub40)	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPEAGRSANHTPAGLTGPG TAEAASASGIWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTCDTPEED GITWTLQSSSEVLGSGKTLTIQVKEFGDAGQYTKHKGGEVLSHS LLLLHKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKNYSGRFTCWW LTTISTDLTFVKSSRGSSDPQGVTGGAATLSAERVGRDNKEYE YSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKLKYENYTSSFFIRDIK PDPPKNLQLKPLKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCVQV QGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKNASISVRAQDRYYSSSWSE WASVPCSGTAEAASASGEAGRSANHTPAGLTGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAP

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1038 (P70M/ P71M Sub40)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATEAGRSASHTPAGLTGPTS ESATPESMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDIT WTS DQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHLL LHKKENGIWSTEILKNFKNKTLKCEAPNYSGRFTCSWL VQRNM DLKFNKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQRDYEKYSVSC QEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPPK NLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKEK MKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYYNSS CSKWACVPCRVRSGTATPESGPGGEAGRSASHTPAGLTGPATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSG GSETPGSEPATSGSETPGSPAG
1039 (P30M Sub40)	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSES ATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPEAGRSAS HTPAGLTGPTSESATPESMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVN LTCDTPEEDDITWTS DQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHK GGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRF TCSWL VQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQ RDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFF IRDIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFF VRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQA QDRYYNSSCSKWACVPCRVR SAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGPSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT
1040 (P26M Sub40)	ASSATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSES ATPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPEAGRSAS HTPAGLTGPTSESATPESMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVN LTCDTPEEDDITWTS DQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHK GGETLSHSHLLLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRF TCSWL VQRNMDLKFNIKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLDQ RDYEKYSVSCQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFF IRDIKPDPPKNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFF VRIQRKKEKMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQA QDRYYNSSCSKWACVPCRVRSGTATPESGPGSEAGRSASHTPA GLTG PATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
	GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET
1041 (P24M Sub40)	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSGPATSESATPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPEAGRSASHTPAGLTGPT SESATPESMWELEKDVYVVEVDWTPDAPGETVNLTCDTPEEDDI TWTSDQRHGVIGSGKTLTITVKEFLDAGQYTCHKGGETLSHSHL LLHKKENGIWSTEILKNFKNKTFLKCEAPNYSGRFTCSWLVRN MDLKFNKSSSSSPDSRAVTCGMASLSAEKVTLQDRDYEKYSVS CQEDVTCPTAEETLPIELALEARQQNKYENYSTSFFIRDIIKPDPP KNLQMKPLKNSQVEVSWEYPDSWSTPHSYFSLKFFVRIQRKKE KMKETEEGCNQKGAFLVEKTSTEVQCKGGNVCVQAQDRYNS SCSKWACVPCRVRSGTATPESGPGGEAGRSASHTPAGLTGPATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSPSATPESGPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSPAG

Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS
1042 (P01M Sub40)	HHHHHHHHGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPEAGRSANH TPAGLTGPGTAEAAASASGRVIPVSGPARCLSQSRNLLKTDDMV KTAREKLKHYSCTAEDIDHEDITRDQTSTLKTCLPLELHKNESCLA TRETSSSTRGSCLPQKTSMMTLCLGSIYEDLKMYQTEFQAINA ALQNHNHQQIILDKGMLVAIDELMQSLNHNGETLRQKPPVGEAD PYRVKMKLCILLHAFSTRVVTINRVMGYLSSAGTAEAAASASGEAG RSANHTPAGLTGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

PRODUCCIÓN RECOMBINANTE

También se proporcionan polinucleótidos que codifican cualquier polipéptido descrito en la presente y/o los complementos inversos de tales polinucleótidos.

- La descripción en la presente incluye un vector de expresión que comprende una secuencia de polinucleótidos, tal como cualquiera descrita en el párrafo anterior, y una secuencia reguladora operativamente unida a la secuencia de polinucleótidos.

La descripción en la presente incluye una célula huésped que comprende un vector de expresión, tal como se describe cualquiera en el párrafo anterior. En algunas modalidades, la célula huésped es un procariota. En algunas modalidades, la célula huésped es *E. coli*. En algunas modalidades, la célula huésped es una célula de mamífero. En algunas modalidades, la célula de mamífero es una línea celular de mamífero, tal como una línea celular HEK 293 o una línea celular CHO.

En algunas modalidades, la descripción proporciona métodos de elaboración de las composiciones en cuestión. En algunas modalidades, tal método comprende el cultivo de una célula huésped que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión descrita en la presente bajo condiciones que promueven la expresión de la proteína de fusión, seguido de la recuperación de la proteína de fusión usando métodos de purificación estándar (p. ej., cromatografía en columna, HPLC, y lo similar) en donde la composición se recupera en donde al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 97 %, o al menos 99 % de las proteínas de fusión están plegadas correctamente. En algunas modalidades del método de fabricación, la proteína de fusión expresada se recupera en la que al menos o al menos 90 %, o al menos 95 %, o al menos 97 %, o al menos 99 % de la proteína de fusión se recupera en forma monomérica soluble.

En algunas modalidades, la descripción se relaciona con métodos de fabricación de una proteína de fusión a altos niveles de expresión de fermentación de proteína funcional usando una célula huésped de *E. coli* o mamífero, así como proporcionar vectores de expresión que codifiquen la proteína de fusión útiles en métodos para producir la proteína de fusión citotóxicamente activa a altos niveles de expresión. En algunas modalidades, el método comprende las etapas de 1) preparar un polinucleótido que codifica una proteína de fusión descrita en la presente, 2) clonar el polinucleótido en un vector de expresión, que puede ser un plásmido u otro vector bajo el control de secuencias de transcripción y traducción apropiadas para la expresión de proteínas de alto nivel en un sistema biológico,

3) transformar una célula huésped apropiada con el vector de expresión, y 4) cultivar la célula huésped en medios nutritivos convencionales en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína de fusión. Cuando se desee, la célula huésped es *E. coli*. Como se usa en la presente, el término “plegado correctamente” significa que el componente de
5 citocina de la composición tiene la capacidad de unirse específicamente al ligando diana de citocina (p. ej., un receptor de citocina y tras la activación). En algunas modalidades, la descripción proporciona un método para producir una proteína de fusión, el método que comprende el cultivo en una reacción de fermentación de una célula huésped que comprende un vector que codifica la proteína de fusión en condiciones efectivas para
10 expresar el producto de proteína de fusión.

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA

En la presente se describe una composición farmacéutica que comprende un polipéptido (tal como una proteína de fusión descrita en la presente), y uno o más excipientes
15 farmacéuticamente aceptables. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula para administración intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraabdominal, intraperitoneal, intravítrea, intratecal, o intramuscular. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula para inyección intravenosa. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está en forma líquida o congelada. En
20 algunas modalidades, la composición farmacéutica se formula como un polvo liofilizado para ser reconstituido antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse para terapia por cualquier vía adecuada. En algunas modalidades, la dosis se administra por vía intradérmica, subcutánea, intravenosa (p. ej., por bolo intravenoso o infusión intravenosa), intraarterial,
25 intraabdominal, intraperitoneal, intratecal, o intramuscular. En algunas modalidades, el sujeto es un ratón, rata, mono, o humano. En modalidades preferidas, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica puede administrarse por vía subcutánea, intramuscular, o intravenosa. En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva. En algunas modalidades, la cantidad terapéuticamente efectiva da como resultado una ganancia en el tiempo empleado dentro de una ventana terapéutica para la proteína de fusión en comparación con la citocina correspondiente de la proteína de fusión no unida al ELNN y administrada a una dosis comparable a un sujeto.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa.

En algunas modalidades, la composición puede suministrarse como un polvo liofilizado o torta para ser reconstituida antes de la administración. En algunas modalidades, la composición también puede suministrarse en forma líquida o congelada, que puede administrarse directamente a un sujeto.

KITS FARMACÉUTICOS

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona kits para facilitar el uso de las proteínas de fusión descritas en la presente. En algunas modalidades, un kit comprende (a) un primer recipiente que comprende la cantidad farmacéuticamente efectiva de las proteínas de fusión descritas en la presente en una composición liofilizada; y (b) un segundo recipiente que comprende un diluyente para reconstituir la formulación liofilizada.

En algunas modalidades, el kit comprende además instrucciones para el almacenamiento del kit, información con respecto a un cáncer que es tratable con las proteínas de fusión descritas en la presente, instrucciones para la reconstitución de la formulación liofilizada, y/o instrucciones de administración.

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En la presente se describen usos de un polipéptido, tal como cualquiera descrito en la presente, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad particular que se tratará dependerá de la elección de las proteínas biológicamente activas. En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer. En la presente se incluyen polipéptidos (p. ej., una proteína de fusión que comprende una citocina, un enlazador que comprende un segmento de liberación escindible por proteasa, y un polipéptido de máscara) para usar en el tratamiento del cáncer. En algunas modalidades, el cáncer o tumor es un tumor sólido.

La presente descripción incluye un método para tratar una enfermedad en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica, tal como cualquiera descrita en la presente. En algunas modalidades, la enfermedad es cáncer. En algunas modalidades, el sujeto es un ratón, rata, mono, o humano. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto que lo necesita, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad de la proteína de fusión descrita en la presente, en donde el cáncer comprende un tumor sólido, y tratar el cáncer comprende reducir el volumen del tumor sólido.

Los siguientes son ejemplos de composiciones y evaluaciones de composiciones de la descripción. Se entiende que pueden practicarse diversas modalidades, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

INCORPORACIÓN COMO REFERENCIA

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente como referencia en la misma medida como si cada

publicación, patente, o solicitud de patente individual se indicara específica e individualmente para incorporarse como referencia.

EJEMPLOS

5

Ejemplo 1. Diseño de citocinas activables por proteasas

Este ejemplo demuestra el diseño de proteínas de fusión de citocina activables por proteasa que incluyen de una a cuatro máscaras, donde cada máscara está unida a la citocina por un enlazador que tiene un segmento de liberación escindible por proteasa. Se diseñaron proteínas de fusión que incluyen IL-12 de ratón (que tienen una subunidad p35 y una subunidad p40) que tienen entre una y cuatro máscaras de ELNN, con diversas longitudes (como se muestra en el número de aminoácidos (AA, por sus siglas en inglés)), con los siguientes formatos:

10

15

Tabla 7. Descripciones de citocina activable por proteasa

Número de máscaras	Identificador	máscara(s) p40	máscara(s) p35
Único	AP2414 (P40~X864/ P35)	864 AA en C-terminal	Ninguno
	AP2447 (X864~P40/ P35)	864 AA en N-terminal	Ninguno
Doble	AP2410 (X864~P40/ P35~X288)	864 AA en N-terminal	288 AA en C-terminal
	AP2411 (X864~P40/ X288~P35)	864 AA en N-terminal	288 AA en N-terminal

	AP2415 (P40~X864/ P35~X288)	864 AA en C- terminal	288 AA en C- terminal
	AP2416 (P40~X864/ X288~288)	864 AA en C- terminal	288 AA en N- terminal
	AP2404 (P40/ X432~P35~X432)	Ninguno	432 AA en N- terminal; 432 AA en C- terminal
Triple	AP2405 (P40~X288/ X288~P35~X288)	288 AA en C- terminal	288 AA en N- terminal; 288 AA en C-terminal
	AP2406 (P40~X288/ X432~P35~X432)	288 AA en C- terminal	432 AA en N- terminal; 432 AA en C- terminal
	AP2407 (X288~P40/ X288~P35~288)	288 AA en N- terminal	288 AA en N- terminal; 288 AA en C-terminal
	AP2408 (X288~P40/ X432~P35~X432)	288 AA en N- terminal	432 AA en N- terminal; 432 AA en C- terminal
	AP2409 (P40~X432/ X288~P35~X288)	432 AA en C- terminal	288 AA en N- terminal; 288 AA en C-terminal
	AP2412 (X432~P40~X432/ P35~X288)	432 AA en N- terminal;	288 AA en C- terminal

		432 AA en C-terminal	
	AP2413 (X432~P40~X432/ X288~P35)	432 AA en N-terminal; 432 AA en C-terminal	288 AA en N-terminal
	AP2450 (X288~P40~X288/ P35~X288)	288 AA en N-terminal; 288 AA en C-terminal	288 AA en C-terminal
Cuádruple	AP2446 (X288~P40~X288/ X288~P35~X288)	288 AA en N-terminal; 288 AA en C-terminal	288 AA en N-terminal; 288 AA en C-terminal

Las proteínas de fusión se expresaron en células Expi293 (ThermoFisher) y se purificaron mediante un método de purificación basado en etiquetas de histidina de una etapa. Brevemente, los constructos de subunidades se cotransfectaron en células Expi293 de manera transitoria. Los sobrenadantes que expresaban la proteína de interés se cosecharon 6-7 días después de la transfección. La proteína se purificó a partir de los sobrenadantes usando una única etapa IMAC para unirse a través de una etiqueta polihistidina (Histrap™ HP 5 ml; Cytiva, 17524801). Versiones desenmascaradas se generaron proteolíticamente usando MMP9, que escinde los sitios de activación de proteasa incorporados y afecta la liberación de máscara. Para la digestión de MMP9 se usó MMP9 (R&D systems) en 20 mM, en 20 mM de histidina, 154 mM de NaCl, 10 mM de CaCl₂, regulador de pH 6,5 con 150 nM cada proteína. La incubación se realizó a 37 °C durante cuatro horas. Se observó que algunos de las digestiones de MMP9 eran parciales (menos de 100 % de desenmascaramiento), lo que sugiere que la diferencia real en el enmascaramiento de pliegue puede ser mayor que la observada basado en este experimento.

Las proteínas de fusión se evaluaron para determinar su capacidad de unirse para activar el receptor de IL-12 de ratón tanto en sus formas enmascaradas como desenmascaradas mediante ensayo reportero de HEK Blue. Las células reporteras de IL-12 de HEK-Blue (InvivoGen) se cultivaron a 37 °C, 5 % CO₂ en un medio de cultivo que consiste en DMEM, 4,5 g/l de glucosa, 2 mM de L-glutamina, 10 % (v/v) suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 100 µg/ml normocina, 1X selección de HEK-Blue. Para el ensayo de actividad de IL-12 se preparó un medio de prueba como se describe en la oración inmediatamente anterior pero sin normocina y antibióticos de selección. El medio de prueba y 1X PBS se calentaron a 37 °C en un baño de agua. Las células se desalojaron del matraz lavando el matraz con el PBS precalentado, seguido de una centrifugación a 300xg (1200 rpm) durante 5 min a temperatura ambiente, determinación de la viabilidad celular, y una resuspensión del pellet celular en el medio de prueba a 0,833x10⁶ células/ml. Noventa microlitros (90 µl) de las células se alicuotaron en cada pocillo de una placa plana de fondo claro de 96 pocillos (Costar, cat. núm. 3595). Los artículos de prueba de IL-12 se prepararon a una concentración 10X en el medio de prueba siendo 17 nM la concentración más alta, seguido de una dilución serial de 10 veces a 1,7 pM. Después, se añadieron 10 µl de la solución 10X a los 90 µl de células, y la placa se incubó durante 24 h. Al día siguiente, se preparó una solución QuantiBlue, el reactivo de detección de fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP, por sus siglas en inglés), diluyendo el reactivo QB y el regulador QB en agua MilliQ a temperatura ambiente a una concentración de 1 % (v/v) cada uno. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se alícuotaron 180 µl a cada pozo de una placa de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pozos, y a cada pozo se añadieron 20 µl del sobrenadante. La placa se incubó a 37 °C, 5 % CO₂ durante 6 h. A diferentes intervalos de tiempo de incubación (15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h), se usó un lector de microplacas para medir la densidad óptica (O.D., por sus siglas en inglés) a 650 nm. Los resultados se analizaron

mediante el software Excel y se presentaron aquí desde el punto temporal de 3 h. Los resultados de este ensayo se muestran en las Figuras 2-3.

Un IL-12 de máscara única (AP2447; X864~P40), un IL-12 de triple máscara (AP2450; X288~P40~X288/ P35~X288) e IL-12 de cuatro máscaras (AP2446; X288~P40~X288/ X288~P35~X288) se expresaron más transitoriamente en células Expi293 y se purificaron como se detalló anteriormente.

Las proteínas de fusión, en sus formas enmascaradas y desenmascaradas, se evaluaron para su actividad de IL-12 de acuerdo con el ensayo reportero de HEK Blue descrito anteriormente y se comparó con la actividad de IL-12 de ratón WT. Las versiones enmascaradas de estas proteínas de fusión proporcionaron 8 veces (máscara única; AP2447), 11 veces (triple máscara, AP2447) o 78 veces (máscara cuádruple, AP2446) disminución de la actividad en comparación con el equivalente desenmascarado. Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Figura 4.

Se realizó un experimento adicional para determinar el efecto de enmascaramiento sobre la actividad de IL-12 de un IL-12 activable por proteasa cuádruple enmascarada (AP2551, X288~P40~X288/ X288~P35~X288), donde la proteína de fusión se purificó completamente y se desenmascaró (100 %) completamente. El AP2551 se purificó mediante cosecha y clarificación del medio acondicionado; cromatografía en columna de exclusión por tamaño (Capto Core 400, Cytiva); captura de intercambio aniónico (AEX, por sus siglas en inglés) (Q Sepharose Fast Flow (QFF), Cytiva); y pulido AEX (Capto Q Impres (Q-IR), Cytiva).

La diferencia cuantitativa de enmascaramiento de pliegue entre la proteína desenmascarada y completamente enmascarada se determinó de acuerdo con el ensayo HEK blue como se detalló anteriormente. La IL-12 de cuatro máscaras demostró un enmascaramiento 430 veces de la actividad de IL-12 en relación con su equivalente desenmascarado (Figura 5).

Los resultados de este ejemplo demuestran que la fusión de máscaras de ELNN puede proporcionar un enmascaramiento significativo de la actividad de IL-12. Adicionalmente, el enmascaramiento dependiente de ELNN de la actividad de IL-12 fue mayor cuando se usaron cuatro máscaras de ELNN. Adicionalmente, tres o cuatro máscaras más cortas (288 AA) proporcionaron un mejor enmascaramiento en comparación con una máscara única más larga (864 AA).

Ejemplo 2. Selección de longitudes de ELNN

Las moléculas de IL-12 activables por proteasa tienen diferentes longitudes de máscara se compararon para la eficacia de enmascaramiento determinada por inducción de IFN γ y para la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo tumoral de ratón. Se evaluó la actividad antitumoral y el mecanismo de acción en modelos de ratones singenéticos usando sustitutos murinos (que incluyen IL-12 murina WT) ya que la IL-12 humana no se une a los receptores de IL-12 de ratón. Se comparó la actividad de enmascaramiento de una molécula de IL-12 que tiene cuatro máscaras de ELNN de 288 aminoácidos de longitud (unidas por enlazadores escindibles por proteasa en C-terminal y N-terminal de las subunidades p35 y p40) con una molécula equivalente que tiene cuatro máscaras de ELNN de 210 aminoácidos. Las moléculas se expresaron y se purificaron completamente como se detalló anteriormente.

Se evaluaron las moléculas sustitutas de ratón P24M (4 x 288aa ELNN) y P26M (4 x 210aa ELNN) para la inducción de IFN γ mediante ensayo de esplenocitos de ratón. El propósito de este ensayo es evaluar la capacidad de las citocinas enmascaradas y activadas proteolíticas para enganchar el IL-12R e inducir la posterior secreción de IFN γ . Esta actividad se mide cuantificando el IFN γ liberado en el sobrenadante por las células. La IL-12 recombinante de ratón se incluye como referencia. En resumen, los bazo se recogieron de múltiples ratones C57Bl/6 hembras y se disociaron mecánicamente en una suspensión unicelular de esplenocitos agrupados. Después de la eliminación de glóbulos rojos,

alícuotas de esplenocitos 5E5 se trataron con P24M terapéutico titulado, P24M activado por MMP (desenmascarado), P26M terapéutico, P26M activado por MMP (desenmascarado), o IL-12 murino recombinante. Los esplenocitos y los artículos de prueba se incubaron durante 48 horas siguiendo métodos de cultivo tisular estándar. Se recogieron sobrenadantes para análisis cuantitativo de IFN γ de ratón mediante ELISA. Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Figura 6. Los resultados demuestran enmascaramiento superior por P24M, con las máscaras de ELNN de 288aa, en comparación con P26M con las máscaras de ELNN de 210aa más cortas.

También se evaluaron las moléculas sustitutas de ratón P24M (4 x 288aa ELNN) y P26M (4 x 210aa ELNN) para la inhibición diferencial del crecimiento tumoral en el modelo de ratón B16F10 melanoma C57BL/6. Brevemente, para el experimento de inhibición del crecimiento tumoral, 130 ratones fueron implantados por vía subcutánea con 100k de células B16F10 en el flanco derecho. Después de 11 días, 24 ratones portantes de tumores con un volumen del tumor promedio de 111 mm³ fueron aleatorizados en 3 grupos de 8 ratones cada uno. Los ratones fueron tratados por vía intravenosa con una dosis semanal de control de diluyente, 3 μ g de P24M, o 3 μ g de P26M. Los ratones se midieron dos veces por semana para el volumen del tumor y el peso corporal. Al día 21, al final del estudio, los ratones tratados con 3 μ g de P24M o P26M presentaban una inhibición promedio del crecimiento tumoral de 80 % y 61 %, respectivamente, en comparación con el grupo de control del diluyente. El tratamiento con P24M, con las máscaras de ELNN de 288aa, tuvo una tendencia de mayor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con P26M con las máscaras de ELNN de 210aa más cortas (Figura 7). Los ratones no presentaron signos de toxicidad por el tratamiento.

Las máscaras cuádruples de 288 aminoácidos cada una proporcionaron un mejor enmascaramiento de los ensayos de actividad in vitro en esplenocitos de ratón y ensayos de eficacia in vivo realizados en modelos tumorales de ratón.

Ejemplo 3. Diseño de ELNN con código de barras

Las secuencias de polipéptidos de ELNN pueden contener opcionalmente un fragmento de código de barras liberable del polipéptido tras la digestión por una proteasa. Un fragmento de código de barras puede ser, p. ej., (1) una porción del ELNN que incluye al menos parte de un motivo de secuencia (no recurrente, no superpuesto) que ocurre solo una vez dentro del ELNN; y (2) difiere en secuencia y peso molecular de todos los demás fragmentos de péptidos que son liberables del polipéptido que los contiene tras la digestión completa del polipéptido por una proteasa. El término “fragmento de código de barras” (“código de barras” o “secuencia de código de barras”) puede referirse a la porción del ELNN fusionada de manera escindible dentro del polipéptido, o al fragmento peptídico resultante liberado del polipéptido. Secuencias de códigos de barras anteriores (ver, p. ej., publicación de patente internacional PCT núm. WO2021/263058, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia) se diseñaron con la intención de crear secuencias polipeptídicas de código de barras únicas con las mutaciones mínimas posibles en la secuencia ELNN original. Sin embargo, tales secuencias de códigos de barras requerían 1000 µg/ml de Glu-C y una digestión nocturna para liberarlas de los péptidos que las contenían. Las secuencias de polipéptidos de código de barras descritas en este ejemplo se diseñaron y probaron para que se desempeñaran contra un segundo criterio: Que el polipéptido de código de barras es liberable del polipéptido de ELNN rápidamente (en aproximadamente dos horas frente a una digestión nocturna) por una baja concentración de proteasa (menos de 30 µg/ml de proteasa); además del criterio de introducir el menor número posible de mutaciones en la secuencia de ELNN original.

Para determinar qué secuencias peptídicas se escindieron más favorablemente por la proteasa Glu-C en una digestión de proteasa de dos horas, se construyó una genoteca de aproximadamente 1000 péptidos cada péptido contiene una secuencia de escisión diferente para la proteasa Glu-C. Las concentraciones equimolares de estos péptidos que contienen sitio de Glu-C se probaron en una digestión de 2 horas contra un rango de

concentraciones de proteasa Glu-C de 0,05 µg/ml a 1000 µg/ml de proteasa. Después de la digestión los péptidos se analizaron mediante espectrometría de masas con cromatografía de líquidos. Se catalogaron las secuencias del sitio de escisión de Glu-C que se escindieron por las concentraciones más bajas de proteasa. De esta lista de las secuencias más rápidas, se seleccionaron unas pocas selectas que fueron más compatibles con polipéptidos de ELNN. Estas secuencias se implementaron entonces para flanquear las nuevas secuencias de códigos de barras “Generación 2”.

Se clonó una selección de secuencias de código de barras de Generación 2 en secuencias ELNN y se probó su desempeño como péptidos de código de barras mediante digestión Glu-C y análisis posteriores de espectrometría de masas con cromatografía de líquidos (LC-MS). Las secuencias de códigos de barras exitosas de este experimento tuvieron 3 criterios: 1.) El péptido de código de barras fue completamente liberable del polipéptido de ELNN en una digestión de 2 horas por una concentración de 40 µg/ml de proteasa. 2.) El péptido de código de barras no se escindió ni se degradó de alguna otra manera por concentraciones mucho más altas de proteasa, y 3.) El péptido de código de barras que cumplía las condiciones 1 y 2 contenía el menor número de mutaciones de la secuencia polipeptídica ELNN original. La Tabla 8 proporciona ejemplos de secuencias de códigos de barras de Generación 2 exitosas de acuerdo con los criterios del proceso de selección antes mencionado.

Tabla 8. Secuencias de códigos de barras de Generación 2 ilustrativas

Nombre	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
Código de barras 01 de Gen 2	SGPE.SGPGTGTSATPE.SGPG	3001

Código de barras 02 de Gen 2	ATPE.SGPGSGPGTSE.SATP	3002
Código de barras 03 de Gen 2	ATPE.SGPGTTPGTTPE.SGPG	3003
Código de barras 04 de Gen 2	ATPE.SGPGTPPTSTPE.SGPG	3004
Código de barras 05 de Gen 2	ATPE.SGPGTSPSATPE.SGPG	3005
Código de barras 06 de Gen 2	ATPE.SGPGTGSA GTPE.SGPG	3006
Código de barras 07 de Gen 2	ATPE.SGPGTGGAGTPE.SGPG	3007
Código de barras 08 de Gen 2	ATPE.SGPGTSPGATPE.SGPG	3008
Código de barras 09 de Gen 2	GTPE.SGPGTSGSGTPE.SGPG	3009
Código de barras 10 de Gen 2	GTPE.SGPGTSSASTPE.SGPG	3010
Código de barras 11 de Gen 2	GTPE.SGPGTGAGTTPE.SGPG	3011
Código de barras 12 de Gen 2	GTPE.SGPGTGSTSTPE.SGPG	3012
Código de barras 13 de Gen 2	GTPE.TPGSEPATSGSE.TGTP	3013
Código de barras 14 de Gen 2	GTPE.GSAPGTSTEPSE.SATP	3014
Código de barras 15 de Gen 2	ATPE.SGPGTAGSGTPE.SGPG	3015

Código de barras 16 de Gen 2	ATPE.SGPGTSSGGTPE.SGPG	3016
Código de barras 17 de Gen 2	ATPE.SGPGTAGPATPE.SGPG	3017
Código de barras 18 de Gen 2	ATPE.SGPGTPGTGTPE.SGPG	3018
Código de barras 19 de Gen 2	TTPE.SGPGTGGPTTPE.SGPG	3019
Código de barras 20 de Gen 2	STPE.SGPGTGSGSTPE.SGPG	3020

La Tabla 9 proporciona secuencias de código de barras de Generación 3 seleccionadas en base a la tasa de escisión de Glu-C y en base a la separación y cuantificación por LC-MS. La figura 8 muestra la incorporación de fragmentos de código de barras en los ELNN de una proteína de fusión de IL-12.

Tabla 9. Secuencias de códigos de barras de Generación 3 ilustrativas

Nombre	Secuencia	Sec. con núm. de ident.:
Código de barras 01 de Gen 3	ATPE.SGPGSGPGTSE.SATP	3021
Código de barras 02 de Gen 3	ATPE.SGPGTSPSATPE.SGPG	3022
Código de barras 03 de Gen 3	ATPE.SGPGSGPATSE.SATP	3023
Código de barras 04 de Gen 3	ATPE.SGPGTSASATPE.SGPG	3024

Ejemplo 4. Ingeniería del sitio de liberación

Se realizó ingeniería del sitio de liberación para (1) eliminar un sitio de glicosilación, y (2) reducir la tasa de escisión en plasma que sorprendentemente se atribuyó a la legumaína.

5

Glicosilación del sitio de liberación

Para evaluar la glicosilación de la proteína de fusión de IL-12, se realizó un protocolo de mapeo péptido modificado. Brevemente, las muestras de proteína de fusión de IL-12 se digirieron con tripsina/LysC y se ejecutaron a través de LC/MS. Los datos se procesaron con el software ProteinMetrics buscando péptidos N-glicosilados. Los eventos de glicosilación observados se validaron manualmente en el software ProteinMetrics y se generó un informe. El informe contiene el sitio de glicosilación y la ocupación del sitio de glicosilación (intensidad del péptido glicosilado/intensidad del péptido glicosilado + intensidad del péptido silvestre no glicosilado).

15 Una proteína de fusión de IL-12 que incluye RSR-2295 (EAGRSANNHTPAGLTGP; sec. con núm. de ident.: 7048) se expresó en una línea celular HEK 293. Se encontró que RSR-2295 estaba N-glicosilado al 50 %. La N-glicosilación y la heterogeneidad resultante del sitio de liberación es indeseable ya que puede afectar la tasa de escisión y especificidad de la proteasa. RSR-2295 se mutó para eliminar el sitio de N-glicosilación. RSR-3213

20 (EAGRSASSHTPAGLTGP; sec. con núm. de ident.: 7628) carece de un sitio de N-glicosilación y por lo tanto no se espera que esté glicosilado.

Escisión de legumaína en plasma

La incubación de una proteína de fusión que incluye RSR-2295 en plasma humano mostró alguna escisión que, aunque no alta, fue inesperada. Investigaciones posteriores revelaron que la escisión en plasma humano se debió sorprendentemente a la legumaína, que anteriormente se creía que estaba específicamente presente en los tejidos tumorales.

Adicionalmente, anteriormente se creía que la escisión de legumaína proporcionaba niveles significativos de desenmascaramiento y activación de proteínas de fusión en tejidos tumorales.

RSR-3213 fue diseñado para evitar la escisión por legumaína. Sorprendentemente, un
5 enlazador escindible por proteasa que incluye la secuencia de liberación RSR-3213 se
escindió menos en plasma pero en cantidades comparables a un enlazador escindible por
proteasa correspondiente que incluye las secuencias de liberación RSR-2295 en múltiples
tipos de tumores (que incluyen carcinoma gástrico (NCI-N87), adenocarcinoma colorrectal
(HT-29), carcinoma de colon (HT-55) tumores). Por lo tanto, las proteínas de fusión que
10 comprenden RSR-3213 tienen especificidad mejorada para los tejidos tumorales sin una
pérdida significativa de activación en los tejidos tumorales.

Digestión *in vitro*:

Se realizaron ensayos de digestión *in vitro* para demostrar que RSR-3213 está escindido
15 por MMP y ST14/matriptasa, pero no legumaína. Se diseñaron proteínas de fusión de
acoplador de células T activables por proteasa (paTCE), cada una incluye un núcleo de
TCE biespecífico que se une a EpCAM y CD3, y dos sitios de liberación escindibles por
proteasa donde cada sitio de liberación está unido a una máscara de polipéptido tal que la
escisión del sitio de liberación libera la máscara de polipéptido. Una primera proteína de
20 fusión de paTCE incluyó RSR-2295 en ambos sitios de liberación que flanquean el núcleo
de TCE. Una segunda proteína de fusión de paTCE incluyó RSR-3213 en ambos sitios de
liberación que flanquean el núcleo de TCE. Los paTCE se expresaron en *E. coli*. Los paTCE
(que contienen RSR-2295 y que contienen RSR-3213) se digirieron con diluciones 5 veces
de MMP9, legumaína, o ST14/matriptasa. Se observaron patrones de bandas similares
25 tanto para MMP9 como para la matriptasa, lo que sugiere que la mutación del sitio de
escisión de la legumaína no afectó la escisión de los sitios de escisión de MMP y proteasa
de serina. Se observó TCE desenmascarado (uTCE) para el paTCE que contenía RSR-

2295 después de la digestión con legumaína, que indica escisión en el enlazador escindible por proteasa por legumaína. No se observó uTCE para el paTCE que contenía RSR-3213 después de la digestión con legumaína, que indica que la mutación evitó con éxito la escisión en el enlazador escindible por proteasa por legumaína (Figura 9A y Figura 9B).

5

Estabilidad del plasma: escisión *in vivo*

Las variantes etiquetadas fluorescentemente de un paTCE que contenía RSR-2295 o RSR-3213 se etiquetaron con Sulfo-Cy5,5 o Sulfo-Cy7,5. Se coinyectaron colores opuestos en ratones que contenían tumores de xenoinjerto NCI-N87, HT-29 o HT-55. 48 horas después de la inyección, los tumores se cosecharon, homogeneizaron, y los extractos de proteínas fueron analizados por SDS-PAGE y LI-COR. Se cuantificaron abundancias relativas para paTCE, un metabolito que incluye una máscara de C-terminal única (1x-C), un metabolito que incluye una máscara de N-terminal única (1x-N), y uTCE. No se observaron diferencias significativas en uTCE y 1x-C entre los dos enlazadores escindibles de proteasa. paTCE que contenía RSR-2295 mostró un aumento pequeño pero estadísticamente significativo (promedio 2,19 % más) en 1x-N que el paTCE correspondiente que contiene RSR-3213. (Figura 10A y Figura 10B).

También se determinó la escisión observada *in vivo* a partir de homogeneizados tumorales a partir de 3 modelos tumorales diferentes de ratón. El % de abundancia para los metabolitos 1x-C, 1x-N y uTCE se midió con los resultados representados en la Figura 10C. Finalmente, la Figura 10D representa el % del total para paTCE más los 3 metabolitos (1x-N, 1x-C, y uTCE) cuando se emplea RSR-2295 o RSR-3213.

En general, estos datos sugieren que las diferencias entre la escisión *in vivo* de RSR-2295 y RSR-3213 son menores en 3 modelos tumorales diferentes.

25

Captación tumoral:

La captación tumoral entre los paTCE que contienen RSR-2295 o RSR-3213 se comparó usando la relación de concentraciones calculadas de fármaco total (paTCE, 1x-C, 1x-N y uTCE). Si bien se observaron diferencias en la captación tumoral en 3 modelos tumorales diferentes, no se observaron diferencias significativas entre RSR-2295 y RSR-3213 dentro de cada modelo. Esto indica que los cambios en los enlazadores escindibles de proteasa entre RSR-2295 y RSR-3213 no afectan a la captación tumoral de paTCE (Figura 11).

Eficacia de citocina activable por proteasa que incluye RSR-3213

Las moléculas de IL-12 activables por proteasa que tienen segmentos de liberación RSR-2295 o RSR-3213 se compararon para determinar la eficacia de enmascaramiento determinada por inducción de IFN γ y para la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo tumoral de ratón. Se evaluó la actividad antitumoral y el mecanismo de acción en modelos de ratones singenéticos usando sustitutos murinos (que incluyen IL-12 murina WT) ya que la IL-12 humana no se une a los receptores de IL-12 de ratón. Una molécula cuádruple de IL-12 enmascarada ELNN que tiene un sitio de liberación RSR-3213 que une IL-12 a cada una de las máscaras ELNN (P24M) se comparó con una molécula cuádruple de IL-12 enmascarada ELNN que tiene un sitio de liberación RSR-2295 que une IL-12 a cada una de las máscaras ELNN. Las moléculas se expresaron y se purificaron completamente como se detalló anteriormente.

Las moléculas sustitutas de ratón P24M (4 x 288aa ELNN; 4 x RSR-3213) y P01M (4 x 288aa ELNN; 4 x RSR-2295) se evaluaron para la inducción de IFN γ mediante ensayo de esplenocitos de ratón. El propósito de este ensayo es evaluar la capacidad de las citocinas enmascaradas y activadas proteolíticas para enganchar el IL-12R e inducir la posterior secreción de IFN γ . Esta actividad se mide cuantificando el IFN γ liberado en el sobrenadante por las células. La IL-12 recombinante de ratón se incluye como referencia. En resumen, los bazo se recogieron de múltiples ratones C57Bl/6 hembras y se disociaron

mecánicamente en una suspensión unicelular de esplenocitos agrupados. Después de la eliminación de glóbulos rojos, alícuotas de esplenocitos 5E5 se trataron con P24M terapéutico titulado, P24M activado por MMP (desenmascarado), P01M terapéutico, P01M activado por MMP (desenmascarado), o IL-12 murino recombinante. Los esplenocitos y los artículos de prueba se incubaron durante 48 horas siguiendo métodos de cultivo tisular estándar. Se recogieron sobrenadantes para análisis cuantitativo de IFN γ de ratón mediante ELISA. Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Figura 12.

Las moléculas sustitutas de ratón P24M (4 x 288aa ELNN; 4 x RSR-3213) y P01M (4 x 288aa ELNN; También se evaluaron 4 x RSR-2295) para la inhibición diferencial del crecimiento tumoral en el modelo de ratón B16F10 melanoma C57BL/6. Brevemente, para el experimento de inhibición del crecimiento tumoral, 130 ratones fueron implantados por vía subcutánea con 100k de células B16F10 en el flanco derecho. Después de 11 días, 24 ratones portantes de tumores con un volumen del tumor promedio de 111 mm³ fueron aleatorizados en 3 grupos de 8 ratones cada uno. Los ratones fueron tratados por vía intravenosa con una dosis semanal de control de diluyente, 3 μ g de P24M, o 3 μ g de P01M. Los ratones se midieron dos veces por semana para el volumen del tumor y el peso corporal. Al día 21, al final del estudio, los ratones tratados con 3 μ g de P24M o P01M presentaban una inhibición promedio del crecimiento tumoral de 80 % y 44 %, respectivamente, en comparación con el grupo de control del diluyente. El tratamiento con P24M, con RSR-3213, tuvo una tendencia de mayor inhibición del crecimiento tumoral en comparación con P01M con RSR-2295 (Figura 13). Los ratones no presentaron signos de toxicidad por el tratamiento.

Ejemplo 5. Glicosilación de IL-12 humana

Para evaluar la glicosilación de las subunidades IL-12 p35 y p40 humanas en el contexto de una proteína de fusión cuádruple enmascarada, se realizó un protocolo de mapeo péptido modificado. Brevemente, las muestras de proteína de fusión se digirieron con

tripsina/LysC y se ejecutaron a través de LC/MS. Los datos se procesaron con el software ProteinMetrics buscando péptidos N-glicosilados. Los eventos de glicosilación observados se validaron manualmente en el software ProteinMetrics y se generó un informe. El informe contiene el sitio de glicosilación y la ocupación del sitio de glicosilación (intensidad del péptido glicosilado/intensidad del péptido glicosilado + intensidad del péptido silvestre no glicosilado).

Las proteínas de fusión de IL-12 activables por proteasa humana y de ratón y la IL-12 humana (no en una proteína de fusión) se produjeron cada una en células HEK 293 y se evaluaron para la glicosilación. Los resultados se proporcionan en la Tabla 10.

Tabla 10. N-glicosilación de IL-12 humana

subunidad de IL-12	Sitio de glicosilación (AA)	hIL-12 (sin fusión)	Proteína de fusión de hIL-12 (con cuatro máscaras de ELNN)	Proteína de fusión de mIL-12 (con cuatro máscaras de ELNN)
P35	N93	100 %	0	0 %
	N107	100 %	0	n/a
	N195	0 %	99 %	n/a
P40	N125	Parcial	0	0 %
	N135	n.d.	0	0 %
	N222	100 %	99 %	99 %
	N303	Parcial	0-0,05 %	n/a

n/a = sin sitio de glicosilación en esta posición en IL-12 de ratón

n.d. = sin datos

El N195 de la subunidad p35 de hIL-12 en proteína de fusión activable por proteasa con cuatro máscaras de ELNN fue 99 % glicosilado pero no se observó glicosilación de N195

en huIL-12 recombinante (no enmascarado). Se plantea la hipótesis de que la N-glicosilación de N195 se creó en las proteínas de fusión de IL-12 mediante la adición de un polipéptido (p. ej., un enlazador y polipéptido de máscara de ELNN) al C-terminal de la subunidad p35. En la IL-12 endógena o recombinantemente producida, el N195 no está glicosilado ya que es 3 aminoácidos del C-terminal de la cadena polipeptídica y es incapaz de ser glicosilado. Se diseñaron proteínas de fusión de IL-12 activables por proteasa para eliminar el sitio de glicosilación p35 N195. Al mutar N195, se seleccionaron sustituciones de aminoácidos que no aumentaban la inmunogenicidad potencial de la proteína de fusión, por ejemplo N195Q.

Ejemplo 6. P72H y P74H, proteínas de fusión de IL-12 activables por proteasas ilustrativas

Este ejemplo proporciona datos relacionados con proteínas de fusión de IL-12 activables por proteasa ilustrativas, P72H y P74H.

P72H comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende IL-12p35 con la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 1000 y una segunda subunidad de polipéptidos que comprende IL-12p40 con la secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 1033. La secuencia de aminoácidos anotada para P72H se proporciona a continuación en la Tabla 11:

Tabla 11. Secuencias P72H

Subunidad	Componente	Sec. con núm. de ident.:	Secuencia
P35	N-ELNN	8026	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSGPGTSESATPGTSESATPESGPGS

		EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGTSESAT* (código de barras subrayado)
RSR-3213	7628	EAGRSASHTPAGLTGP
Espaciador	99	GTPESATPES
hIL-12-p35	8050	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVS NMLQKARQTLEFY PCTSEEIDHEDITKDK TSTVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITN GSCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQ VEFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVI DELMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKT KIKLCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLNAS
Espaciador	100	GTATPESAP
RSR-3213	7628	EAGRSASHTPAGLTGP
C-ELNN	8028	ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSASATPESGPGSEPATSGS

			ETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGEPEA (código de barras subrayado)
P40	N-ELNN	8023	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES <u>SG</u> <u>PGSGPATSE</u> SATPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGTSESAT* (código de barras subrayado)
	RSR-3213	7628	EAGRSASHTPAGLTGP
	Espaciador	98	TSESATPES
	hIL-12-p40	8051	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLT CDTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTI QVKEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLL HKKEDGIWSTDILKDQKEPKNKTF LRCE AKNYSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSR GSSDPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEY EYSVECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAV HKLKYENYTSSFFIRDIKPDPPKNLQLKP LKNSRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLT FCVQVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVIC

			RKNASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	Espaciador	97	GTATPESGPG
	RSR-3213	7628	EAGRSASHTPAGLTGP
	C-ELNN	8025	ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG <u>PGTSPSATPESGPGSEPATSGSETPGS</u> EPATSGSETPGSPAG

*puede incluir opcionalmente un residuo “prolina” de C-terminal en N-ELNN de cada subunidad

P74H comprende una primera subunidad de polipéptidos que comprende IL-12p35 con la
5 secuencia de aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 1002 y una
segunda subunidad de polipéptidos que comprende IL-12p40 con la secuencia de
aminoácidos establecida como la sec. con núm. de ident.: 1033. P74H incluye una
subunidad variante p35 que está aglicosilada en N195 (N195Q). La secuencia de
aminoácidos anotada para P74H se proporciona a continuación en la Tabla 12:

Tabla 12. Secuencias P74H

Subunidad	Componente	Sec. con núm. de ident.:	Secuencia
P35	N-ELNN	8026	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSGPGTSESATPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSESAT* (código de barras subrayado)
	RSR-3213	7628	EAGRSASHTPAGLTGP
	Espaciador	99	GTPESATPES
	hIL-12-p35 (N195Q)	8053	RNLPVATPDPGMFPC LHHSQNLLRAVSN MLQKARQTLEFYPTSEEIDHEDITKDKT STVEACLPLELTKNESCLNSRETSFITNG SCLASRKTSFMMALCLSSIYEDLKMYQV EFKTMNAKLLMDPKRQIFLDQNMLAVIDE LMQALNFNSETVPQKSSLEEPDFYKTKIK LCILLHAFRIRAVTIDRVMSYLQAS (N195Q negrita)
	Espaciador	100	GTATPESAP

	RSR-3213	7628	EAGRSASHTPAGLTGP
	C-ELNN	8028	ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP <u>ESGPGTSASATPE</u> SGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGEPEA (código de barras subrayado)
P40	N-ELNN	8023	ASGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP <u>ESGP</u> <u>GSGPATSESAT</u> PGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESAT* (código de barras subrayado)
	RSR-3213	7628	EAGRSASHTPAGLTGP
	Espaciador	98	TSESATPES
	hIL-12-p40	8051	IWELKKDVYVVELDWYPDAPGEMVVLTC DTPEEDGITWTLDQSSEVLGSGKTLTIQV KEFGDAGQYTCHKGGEVLSHSLLLLHKK

			EDGIWSTDILKDQKEPKNKTFLRCEAKN YSGRFTCWWLTTISTDLTFSVKSSRGSS DPQGVTCGAATLSAERVGRDNKEYEYS VECQEDSACPAAEESLPIEVMVDAVHKL KYENYTSSFFIRDIIKPDPPKNLQLKPLKN SRQVEVSWEYPDTWSTPHSYFSLTFCV QVQGKSKREKKDRVFTDKTSATVICRKN ASISVRAQDRYYSSSWSEWASVPCS
	Espaciador	97	GTATPESGPG
	RSR-3213	7628	EAGRSASHTPAGLTGP
	C-ELNN	8025	ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGTSESATPES <u>SGPGTSPS</u> <u>ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS</u> ETPGSPAG

*puede incluir opcionalmente un residuo "prolina" de C-terminal en N-ELNN de cada subunidad

Los métodos para producir proteínas de fusión de citocina activables por proteasa son conocidos en la técnica, p. ej., como se describe en la publicación de patente internacional PCT núm. WO2021/262985.

En algunos de los experimentos a continuación, se usan sustitutos de ratón para P72H y P74H. Se evaluó la actividad antitumoral y el mecanismo de acción en modelos de ratón

singenéico usando sustitutos murinos ya que la IL-12 humana no se une a los receptores de IL-12 de ratón.

P71M es el sustituto de ratón para P72H. P71M es idéntico a P72H excepto que la IL-12 humana ha sido reemplazada por IL-12 de ratón en el sustituto de ratón P71M.

5 Adicionalmente, la IL-12 de ratón de P71M se ha mutado para introducir un sitio de glicosilación N195 (no presente en ratón, introducido para imitar mejor el patrón de glicosilación de la IL-12 humana en P72H).

P70M es el sustituto de ratón para P74H excepto que la IL-12 humana ha sido reemplazada por IL-12 de ratón en la sustituta de ratón P70M. P74H contiene una versión aglicosilada

10 N-195 de IL-12 humana y por lo tanto la IL-12 de ratón WT, que naturalmente carece de N195, puede usarse como sustituto.

Caracterización *in vitro* de proteínas de fusión sustitutas de ratones P71M y P70M

P71M es el sustituto de ratón para P72H, como se describió anteriormente. P70M es el
15 sustituto de ratón para P74H, como se describió anteriormente.

La fusión de un ELNN al C-terminal de la subunidad IL-12 P35 humana da como resultado glicosilación adicional del sitio N195 como se describió anteriormente. El C-terminal del ratón IL-12 P35 difiere en secuencia de la secuencia humana correspondiente y no exhibe esta glicosilación extra. La variante sustituta de ratón equivalente P71M se diseñó para
20 tener un patrón de glicosilación similar al P72H humano para investigar si hay algún efecto in vitro o in vivo de la glicosilación N195 en la P72H humana sobre la actividad de IL-12 y/o el perfil farmacocinético.

Las moléculas sustitutas de ratón P71M (glicosiladas en N195 de P35; sustituto de P72H) y P70M (carente de posición de glicosilación en N195; se evaluó el sustituto de P74H que
25 contiene una mutación P35 N195Q para la unión al receptor de IL-12 de ratón (mIL-12R) mediante SPR. El ensayo SPR se ejecutó sobre Biacore T200 a 25 grados Celsius. El tipo de chip que se usó fue el chip sensor CM5 de Serie S. Para cada antígeno, se hizo un chip

separado. Para hIL-12RB2, el anticuerpo anti-His se inmovilizó en la superficie del chip CM5. Para mL-12RB2 y cIL-12RB2, el anticuerpo Fc antirratón se inmovilizó sobre la superficie del chip CM5. El regulador en ejecución que se usó fue PBS-P+ de Cytiva. Los chips se regeneraron mediante HCl de glicina 10 mM, pH 1,5. El flujo de muestra fue 30 µl/min, mientras que el flujo de captura fue 10 µl/min. El tiempo de asociación fue 100 segundos. El tiempo de disociación fue 360 segundos. Cada muestra se evaluó como titulación que variaba de 500 nM a 0,68 nM. Sersogram se ajustó globalmente como un modelo de interacción cinética 1:1 usando el software de evaluación Biacore T200.

Los datos de afinidad de unión se muestran en la Tabla 13. Una curva de unión bifásica observada con mL-12Rβ1. Las tendencias de afinidad fueron similares a las determinadas para mL-12Rβ2.

Tabla 13. Afinidad de moléculas sustitutas de ratón a mL-12Rβ2

Elemento de prueba	mL-12Rβ2 KD (nM)
mIL-12	6,8
P70 desenmascarado	26
P70 enmascarado	370
P71 desenmascarado	23
P71 enmascarado	350

También se evaluaron P71M y P70M para la inducción de IFNγ mediante ensayo de esplenocito de ratón. El propósito de este ensayo es evaluar la capacidad de las citocinas enmascaradas y activadas proteolíticas para enganchar el IL-12R e inducir la posterior

secreción de IFN γ . Esta actividad se mide cuantificando el IFN γ liberado en el sobrenadante por las células. La IL-12 recombinante de ratón se incluye como referencia. Los bazo se recogieron de múltiples ratones C57Bl/6 hembras y se disociaron mecánicamente en una suspensión unicelular de esplenocitos agrupados. Después de la
5 eliminación de glóbulos rojos, alícuotas de esplenocitos 5E5 se trataron con P70M terapéutico titulado, P70M activado por MMP (desenmascarado), P71M terapéutico, P71M activado por MMP (desenmascarado), o IL-12 murino recombinante. Los esplenocitos y los artículos de prueba se incubaron durante 48 horas siguiendo métodos de cultivo tisular estándar. Se recogieron sobrenadantes para análisis cuantitativo de IFN γ de ratón
10 mediante ELISA. Los resultados se proporcionan en la Figura 14.

Los sustitutos de ratón, P70M (N195 aglicosilada) y P71M (N195 glicosilada), exhibieron valores similares de EC₅₀ de 2,6 nM y 2,8 nM, respectivamente. Sus contrapartes activadas proteolíticas fueron más igualmente activas a 0,0031 nM y 0,0013 nM, respectivamente. Ambos fueron comparables a la IL-12 recombinante de ratón (EC₅₀
15 0,0017 pM). La protección de plegado conferida por las construcciones enmascaradas en relación con las contrapartes activadas por MMP demuestra una potencia reducida que varía de 100 veces a 1000 veces.

Farmacocinética de las proteínas de fusión sustitutas de ratones P71M y P70M

20 P71M es el sustituto de ratón para P72H, como se describió anteriormente. P70M es el sustituto de ratón para P74H, como se describió anteriormente.

Se evaluó el impacto de la glicosilación de N195 en el dominio P35 sobre la farmacocinética de la IL-12 murina enmascarada y desenmascarada en ratones C57BL/6 no portantes de tumores. Se administró a doce ratones cada uno una dosis intravenosa en bolo único de
25 70 μ g de P70M o P71M desenmascarados (24 ratones totales). Las muestras de plasma se recogieron de 3 ratones en cada grupo de dosis antes de la administración IV y a 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 y 48 horas después de la dosis. Adicionalmente, a 24 ratones cada uno se

les administró una dosis intravenosa en bolo único de 30 µg de P70M y P71M enmascarados. Las muestras de plasma se recogieron de 3 ratones en cada grupo de dosis antes de la administración y a 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 (n=6), 48 (n=6), 72, 96, 168 y 240 horas después de la dosis. Se cuantificó la concentración de P70M y P71M enmascarados y desenmascarados usando ensayos de unión de ligando calificados. Los parámetros farmacocinéticos se determinaron para cada elemento de prueba mediante análisis no compartimental usando perfiles compuestos.

Como se muestra en la Figura 15, la IL-12 murina desenmascarada se eliminó aproximadamente 100 veces más rápido que la IL-12 murina enmascarada, lo que respalda el uso de las máscaras para prolongar la vida media. La adición del sitio de glicosilación N195 en P71M resultó en una vida media de eliminación modestamente más corta de la IL-12 murina desenmascarada, lo que sugiere que la glicosilación de N195 tiene un impacto en la farmacocinética de la IL-12 murina desenmascarada. En contraste, la adición del sitio de glicosilación N195 no tuvo impacto en la farmacocinética de la IL-12 murina enmascarada, lo que sugiere que la presencia de las máscaras puede interferir con la eliminación específica de glicosilación de la IL-12 murina. Los valores de aclaramiento (CL, por sus siglas en inglés) y la vida media terminal (T_{1/2}) se proporcionan en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores de aclaramiento (CL) y vida media terminal (T_{1/2}) de moléculas sustitutas de ratón

Artículo de prueba	Dosis (µg)	CL (ml/h/kg)	T_{1/2} (h)
P70 enmascarado	30	1,44	21,4
P71 enmascarado	30	1,77	21,5

P70 desenmascarado	70	266	1,94
P71 desenmascarado	70	202	1,43

Eficacia y toxicidad de las proteínas de fusión sustitutas de ratones P71M y P70M

P71M es el sustituto de ratón para P72H, como se describió anteriormente. P70M es el sustituto de ratón para P74H, como se describió anteriormente.

- 5 P70M (secuencia nativa de IL-12 de ratón) y P71M (sitio de glicosilación N195 añadido en la subunidad P35) se evaluaron para la inhibición diferencial del crecimiento tumoral y la toxicidad en el modelo de ratón MC38 de carcinoma de colon C57BL/6. Los resultados se proporcionan en la Figura 16.

Brevemente, para el experimento de inhibición del crecimiento tumoral, 120 ratones fueron
10 implantados por vía subcutánea con 250 k de células MC38 en el flanco derecho. Después de 14 días, 40 ratones portantes de tumores con un volumen del tumor promedio de 101 mm^3 fueron aleatorizados en 5 grupos de 8 ratones cada uno. Los ratones fueron tratados por vía intravenosa con una dosis semanal de control de diluyente, 3 μg de P70M, 10 μg de P70M, 3 μg de P71M, o 10 μg de P71M. Los ratones se midieron dos veces por
15 semana para el volumen del tumor y el peso corporal. Al día 31, al final del estudio, los ratones tratados con 3 μg de P70M o P71M presentaban una inhibición promedio del crecimiento tumoral de 56 % y 45 %, respectivamente, en comparación con el grupo de control del diluyente. Los ratones tratados con 10 μg de P70M o P71M presentaron una inhibición promedio del crecimiento tumoral de 91 % y 86 %, respectivamente. Estos datos
20 indican que P70M y P71M exhiben una eficacia antitumoral dependiente de la dosis similar cuando se usa P70M o P71M. Los ratones no presentaron signos de toxicidad por el tratamiento.

Para el experimento de toxicidad, 130 ratones fueron implantados por vía subcutánea con 250k de células MC38 en el flanco derecho. Después de 14 días, 54 ratones
25 portantes de tumores con un volumen del tumor promedio de 80 mm^3 fueron distribuidos

aleatoriamente en 3 grupos de 18 ratones cada uno. Los ratones fueron tratados por vía intravenosa dos veces por semana con control de diluyente, 100 µg de P70M, o 100 µg de P71M. Los ratones fueron evaluados diariamente para detectar signos de toxicidad declarada, que se definió por muerte, morbilidad, o pérdida porcentual de peso corporal mayor que 15 %. Para los últimos 5 días del estudio (día 11 y 15 después del inicio de la dosificación), P70M y P71M presentaron toxicidad manifiesta similar en 44 % y 50 % de los animales, respectivamente.

Caracterización *in vitro* de proteínas de fusión P72H y P74H

Se realizaron ensayos *in vitro* para caracterizar la unión del receptor IL-12 (IL-12R) y la actividad de P72H y P74H humanos. Se midió la afinidad de unión de P72H y P74H contra IL-12Rβ humano y mono cynomolgus, por SPR. El ensayo se ejecutó en Biacore T200 a 25 grados Celsius. El tipo de chip que se usó fue el chip sensor CM5 de Serie S. Para cada antígeno, se hizo un chip separado. Para hIL-12RB2, el anticuerpo anti-His se inmovilizó en la superficie del chip CM5. Para mL-12RB2 y cIL-12RB2, el anticuerpo Fc antirratón se inmovilizó sobre la superficie del chip CM5. El regulador en ejecución que se usó fue PBS-P+ de Cytiva. Los chips se regeneraron mediante HCl de glicina 10 mM, pH 1,5. El flujo de muestra fue 30 µl/min, mientras que el flujo de captura fue 10 µl/min. El tiempo de asociación fue 100 segundos. El tiempo de disociación fue 360 segundos. Cada muestra se evaluó como titulación que variaba de 500 nM a 0,68 nM. Sersogram se ajustó globalmente como un modelo de interacción cinética 1:1 usando el software de evaluación Biacore T200.

Los datos de afinidad se muestran en la Tabla 15. Se observó una curva de unión bifásica con IL-12Rβ1. Las tendencias de afinidad fueron similares a las determinadas para IL-12Rβ2.

Tabla 15. Afinidad de P72H y P74H con IL-12R β humano y de mono cynomolgus

Elemento de prueba	hIL-12R β 2 KD (nM)	cIL-12R β 2 KD (nM)
hIL-12	52,6	16,7
cIL-12	105,7	52,1
P72 desenmascarado	50,7	11,9
P72 enmascarado	88,2	77,9
P74 desenmascarado	53,9	10,7
P74 enmascarado	78,1	45,4

La actividad se determinó por su respectiva capacidad para inducir la secreción corriente
5 abajo de IFN γ en el sobrenadante por las células. Las PBMC congeladas de un donante humano único se descongelaron rápidamente, se lavaron, y se resuspendieron. Las alícuotas de las PBMC 5E6 se activan con 5 μ g/ml de anticuerpo monoclonal anti-CD3 (clon OKT3) en 3 ml de medio durante 48 horas siguiendo los métodos de cultivo tisular estándar. Las PBMC activadas se alícuotaron en células 1E5 y se combinaron con P72H
10 terapéutico titulado, P72H activado por MMP (desenmascarado), P74H terapéutico, P74H activado por MMP (desenmascarado), o IL-12 humana recombinante. Las células y los reactivos terapéuticos se incuban durante 48 horas. Se recogieron sobrenadantes para análisis cuantitativo de IFN γ humano mediante ELISA. Este experimento se repitió por triplicado, cada uno utilizando un donante de PBMC humano único. Los resultados se
15 proporcionan en la Figura 17.

Los constructos humanos, P72H y P74H, suscitaron una mediana de valores de EC50 de 1 nM y 1,4 nM, respectivamente, a través de los tres donantes. Similarmente, las

contrapartes activadas proteolíticamente fueron más activas, 0,0055 nM y 0,0093 nM, respectivamente. Esto es comparable a la actividad exhibida por IL-12 humana recombinante (EC50 0,0065 nM). Sin embargo, las máscaras confirieron una potencia reducida de 100 veces.

5 Si bien en la presente se han mostrado y descrito modalidades preferidas de la presente invención, será obvio para los expertos en la técnica que tales modalidades se proporcionen únicamente a manera de ejemplo. No se pretende que la invención esté limitada por los ejemplos específicos proporcionados dentro de la memoria descriptiva. Si bien la invención se ha descrito con referencia a la memoria descriptiva antes mencionada,
10 las descripciones e ilustraciones de las modalidades en la presente no pretenden interpretarse en un sentido limitante. Ahora se producirán numerosas variaciones, cambios, y sustituciones a los expertos en la técnica sin apartarse de la invención. Además, se entenderá que todos los aspectos de la invención no se limitan a las ilustraciones, configuraciones o proporciones relativas específicas establecidas en la presente que
15 dependen de una variedad de condiciones y variables. Debe entenderse que pueden emplearse diversas alternativas a las modalidades de la invención descritas en la presente para poner en práctica la invención. Por lo tanto, se contempla que la invención abarque también cualquiera de tales alternativas, modificaciones, variaciones o equivalentes. Se pretende que las siguientes reivindicaciones definan el alcance de la invención y que los
20 métodos y estructuras dentro del alcance de estas reivindicaciones y sus equivalentes estén cubiertos por estas.