(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202092126 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.05.24

(22) Дата подачи заявки
2019.03.08

(51) Int. Cl. ***A61K 38/16*** (2006.01)
C07K 14/21 (2006.01)
C07K 14/28 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)
C12N 9/10 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ТОКСИНОВ КОНСТРУКЦИИ ДОСТАВКИ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ

(31) **62/640,188; 62/640,194; 62/640,168; 62/756,889**
(32) **2018.03.08; 2018.03.08; 2018.03.08; 2018.11.07**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/021474**
(87) **WO 2019/173787 2019.09.12**

(71) Заявитель:
ЭППЛАЙД МОЛЕКЬЮЛАР ТРАНСПОРТ ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Мрсни Рэндалл Дж., Лю Кейи, Маккэй Джулия Дон, Фэн Вэйцзюнь, Хантер Томас Карл (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к выделенным не существующим в природе конструкциям доставки, содержащим полученную из бактериальных токсинов конструкцию доставки, соединенную с биологически активным терапевтическим грузом; причем конструкция доставки способна доставлять биологически активный груз посредством трансцитозной транспортировки через эпителиальную клетку; и при этом конструкция доставки не содержит полученного из бактериальных токсинов транслокационного домена или полученного из бактериальных токсинов каталитического (цитотоксического) домена.

202092126 A1

202092126 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565275EA/019

НОВЫЕ ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ТОКСИНОВ КОНСТРУКЦИИ ДОСТАВКИ ДЛЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ

Перекрестная ссылка

[1] Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с временными заявками на выдачу патента США №№ 62/640168, поданной 8 марта 2018 г.; 62/640188 поданной 8 марта 2018 г.; и 62/640194 поданной 8 марта, причем эти заявки полностью включены в настоящее описание посредством ссылки для всех целей.

Список последовательностей

[2] В настоящей заявке содержится Список последовательностей в форме «бумажной копии» (файла PDF) и файла, содержащего упоминаемые последовательности (SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 221) в машиночитаемой форме (ST25 формат тесового файла), который представлен в данном документе. Список последовательностей показан с использованием стандартного трехбуквенного кода для аминокислот, как определено в 37 C.F.R. 1822. Указанная ASCII копия, созданная 8 марта 2019 г. Называется 40566-711_601_SL.txt и имеет размер 350816 байт.

Уровень техники

[3] Эпителий кишечника препятствует попыткам перорального введения макромолекулярных биопрепаратов, потому что белки не могут диффундировать через барьер или проникать через плотные контакты. Когда они поглощаются за счет эндоцитоза - единственным оставшимся им путем - они, как правило, разлагаются в лизосомах, а не транспортируются в организм. Эта неспособность легкого поглощения через эпителий кишечника продолжает оставаться ограничивающим фактором при разработке коммерчески жизнеспособных пероральных составов этих средств. Наиболее распространенное решение состоит в использовании системного введения, но это часто может вызывать значительные побочные эффекты и снижать удобство для пациента, что отрицательно сказывается на соблюдении режима лечения.

Включение посредством ссылки

[4] Все ссылки, раскрытые в настоящей заявке, полностью включены в нее посредством ссылки для всех целей.

Сущность изобретения

[5] В настоящем раскрытии представлены способы и композиция для транспортировки и/или доставки грузовой молекулы в определенное местоположение (местоположения) внутри клетки (например, супрануклеарное местоположение) или через клетку (например, эпителиальную клетку), либо in vitro, либо in vivo (например, у грызуна или человека). Такой груз можно направить в какое-то место (ряд мест) путем связывания его с молекулой-переносчиком. Такая молекула-переносчик может взаимодействовать с уникальными рецепторами как на клеточной поверхности, так и внутри клетки для нацеленной доставки груза. В настоящей заявке описаны различные такие носитель, грузы

и способы их использования.

[6] В раскрытии представлена выделенная конструкция доставки, которая может содержать: носитель, полученный из домена I экзотоксина и с отсутствующим доменом II, доменом Ib и доменом III экзотоксина, соединенный с гетерологичным грузом. Носитель может состоять по существу из домена I экзотоксина. Конструкция доставки может доставлять гетерологичный груз согласно одному или нескольким из следующих путей: через эпителиальную клетку посредством трансцитоза; к базальной стороне эпителиальной клетки; в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки; или во внутреннюю часть эпителиальной клетки посредством эндоцитоза. В некоторых аспектах носитель выполнен с возможностью доставки гетерологичного груза к базальной стороне эпителиальной клетки.

[7] В раскрытии представлена выделенная конструкция доставки, которая может содержать: химерный носитель, содержащий внутриклеточный эпителиальный нацеливающий домен; соединенный с гетерологичным грузом.

[8] В раскрытии представлена выделенная конструкция доставки, которая может содержать: химерный носитель, содержащий супрануклеарный эпителиальные нацеливающий домен; соединенный с гетерологичным грузом.

[9] В раскрытии представлена выделенная конструкция доставки, которая может содержать: носитель, соединенный с гетерологичным грузом, причем носитель взаимодействует с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана, и не проявляет взаимодействие с одним или более элементами из клатрина или GPR78 или их комбинацией. Взаимодействие может представлять собой селективное взаимодействие. Взаимодействие может представлять собой pH-зависимое взаимодействие. Взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана может происходить на поверхности эпителиальной клетки, во внутренней части эпителиальной клетки или в их комбинации. Доставка гетерологичного груза через эпителиальную клетку может происходить in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки в базолатеральный компартмент. Доставка гетерологичного груза может происходить in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки во внутреннюю часть эпителиальной клетки. Доставка гетерологичного груза может происходить in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки. Взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана или их комбинацией может происходить in vitro на апикальной поверхности эпителиальной клетки, во внутренней части эпителиальной клетки или представляет собой их комбинацию. Эпителиальная клетка может быть поляризованной эпителиальной клеткой. Поляризованная эпителиальная клетка может быть частью монослоя поляризованных эпителиальных клеток. Поляризованная эпителиальная клетка может происходить от грызуна или человека. Поляризованная эпителиальная клетка

может происходить от человека. Человеческая поляризованная эпителиальная клетка может быть человеческой поляризованной эпителиальной клеткой кишечника. Человеческая поляризованная эпителиальная клетка кишечника может быть клеткой Caco-2. Доставка гетерологичного груза через эпителиальную клетку может происходить in vivo из кишечника субъекта в базолатеральный компартмент субъекта. Доставка гетерологичного груза может происходить in vivo из кишечника субъекта во внутреннюю часть эпителиальной клетки субъекта. Доставка гетерологичного груза может происходить in vivo из кишечника субъекта в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки субъекта. Взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и перлекана или их комбинацией может происходить in vivo на апикальной поверхности эпителиальной клетки субъекта, во внутренней части эпителиальной клетки субъекта или в их комбинации. Субъектом может быть грызун или человек. Субъектом может быть человек с одним или более следующими заболеваниями: воспалительное заболевание кишечника, псориаз, бактериальный сепсис, системная красная волчанка (SLE), вульгарная пузырчатка, миастения гравис, гемолитическая анемия, тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Грейвса, болезнь Шегрена, дерматомиозит, болезнь Хашимото, полимиозит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз (MS), сахарный диабет, ревматоидный артрит, склеродермия, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, хроническая лимфоцитарная лейкемия, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественная миелома, карцинома мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки, злокачественная меланома, резистентная к ритуксимабу NHL или лейкемия, диабет, ожирение, диабет вследствие ожирения, гипергликемия, дислипидемия, гипертриглицеридемия, синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическая дислипидемия, гиперлипидемия, дефицит гормона роста (GHD), синдром Тернера (TS), синдром Нунан, синдром Прадера-Вилли, дефицит гомеобокс-содержащего гена низкого роста (SHOX), хроническая почечная недостаточность или синдром короткой кишки с идиопатической низкорослостью. Эпителиальная клетка может быть поляризованной эпителиальной клеткой. Поляризованная эпителиальная клетка может быть поляризованной эпителиальной клеткой кишечника. Носителем может быть малая молекула, полипептид, аптамер или их комбинация. Носителем может быть малая молекула. Носителем может быть полипептид. Полипептид может представлять собой антитело или его функциональный фрагмент. Носителем может быть аптамер. Носитель можно получить из экзотоксина. Носитель может быть получен из домена I экзотоксина и не имеет домена II, домена Ib и домена III экзотоксина. Носитель, который можно получить из домена I экзотоксина, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью домена I экзотоксина или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, причем экзотоксин

представляет собой токсин Cholix или экзотоксин A Pseudomonas. В некоторых аспектах носитель содержит по меньшей мере 110 аминокислотных остатков домена I экзотоксина. В некоторых аспектах носитель содержит по меньшей мере 50 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель, у которого отсутствует домен II, домен Ib и домен III экзотоксина, может содержать часть домена II, домена Ib или домена III экзотоксина или их комбинацию. Часть может содержать не более 70% аминокислотных остатков домена II, домена Ib или домена III экзотоксина. Экзотоксином может быть токсин Cholix. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Носитель

может иметь пространственную структуру, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 148 или SEQ ID NO: 149 находятся в непосредственной близости с одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 151, а один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 148 или SEQ ID NO: 149 находятся в непосредственной близости с одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 152. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-187 или 1-206 SEQ ID NO: 11 или 1-186 или 1-205 SEQ ID NO: 10. Носитель может содержать остатки 1-187 SEQ ID NO: 30 или 1-186 SEQ ID NO: 31 и не более 206 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-151 или 1-187 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. у носителя могут отсутствовать любые один или более аминокислотных остатков 1-39 SEQ ID NO: 5 или аминокислотных остатков 1-38 SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать остатки 1-151 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-150 SEQ ID NO: 4 и не более 187 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-150 SEQ ID NO: 6 или одного или более аминокислотных остатков 1-151 SEQ ID NO: 7. Носитель может содержать остатки 1-134 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-133 SEQ ID NO: 4 и не более 151 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 106 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или ее функциональный фрагмент. Носитель или выделенная конструкция доставки может содержать по меньшей мере одну, но не более 20 бета цепей. Экзотоксином может быть экзотоксин A Pseudomonas. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 80% идентичность с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-252 SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать не более 252 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 134. В некоторых аспектах носитель содержит остатки 1-252 SEQ ID NO: 134. Носитель может содержать по меньшей мере один N-концевой метиониновый остаток. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки может образовать мультимер. Мультимер может быть образован путем мультимеризации

гетерологичного груза. Мультимером может быть гетеромер или гомомер. Гомомер может представлять собой гомодимер. Гомодимер может быть образован путем димеризации гетерологичного груза.

[10] В настоящем раскрытии представлена выделенная конструкция доставки, которая может содержать: носитель, содержащий первую часть и вторую часть, причем первую часть получают из первого экзотоксина, а вторую часть получают из второго экзотоксина; соединенная с гетерологичным грузом. Первым экзотоксином может быть Cholix. Вторым экзотоксином может быть PE. Первую часть можно получить из домена I, домена II, домена Ib или домена III Cholix или любых их комбинаций. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125 или SEQ ID NO: 133, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Вторую часть можно получить из домена I, домена II, домена Ib или домена III PE или любых их комбинаций. Вторая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 145, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первую часть можно химически соединить или рекомбинантно соединить со второй частью. Первую часть можно прямо или непрямо соединить со второй частью. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147. Носитель можно химически соединить или рекомбинантно соединить с гетерологичным грузом. Носитель можно ковалентно соединить с гетерологичным грузом. Гетерологичный груз можно соединить с С-концом носителя. Гетерологичный груз можно соединить с N-концом носителя. Носитель можно соединить прямо с гетерологичным грузом. Носитель можно соединить непрямо с гетерологичным грузом. Носитель можно соединить с гетерологичным грузом посредством спейсера. Спейсер может содержать аминокислотный спейсер. Аминокислотный спейсер может иметь от 1 до 50 аминокислотных остатков в длину. Аминокислотный спейсер может содержать один или более глициновых остатков и один или более сериновых остатков. Спейсером может быть расщепляемый спейсер. Расщепляемый спейсер может содержать аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 174 - SEQ ID NO: 206. Спейсером может быть нерасщепляемый спейсер. Нерасщепляемый спейсер может содержать одну или

несколько аминокислотных последовательностей GTGGS (SEQ ID NO: 207), GGGGS (SEQ ID NO: 208), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 209), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210) или GGGGSGGG (SEQ ID NO: 211). Нерасщепляемый спейсер может содержать одну или несколько $(GGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 212), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Нерасщепляемый спейсер может содержать одну или несколько $(GS)_x$ (SEQ ID NO: 213), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Спейсер может содержать один или более фрагментов домена II, домена Ib или домена III экзотоксина или их комбинацию. Спейсер может содержать не более 80 аминокислотных остатков домена II, 80 аминокислотных остатков домена III или их комбинацию. Гетерологичным грузом может быть макромолекула, малая молекула, полипептид, нуклеиновая кислота, мРНК, микроРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловая молекула, антитело, ДНК, плазмида, вакцина, полимер, наночастица или каталитически активный материал. Гетерологичным грузом может быть биологически активный груз. Биологически активным грузом может быть цитокин, гормон, терапевтическое антитело, его функциональный фрагмент или любые их комбинации. Цитокином может быть IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29 или IL-30. Цитокин может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или SEQ ID NO: 218. Гормон может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или SEQ ID NO: 216. терапевтическим антителом может быть антитело против TNFa. Антителом против TNFa может быть адалимумаб или инфликсимаб. Гетерологичным грузом может быть обнаруживаемое средство. Обнаруживаемым средством может быть флуорофор, контрастное средство, рентгеноконтрастное средство, PET средство, наночастица или радиоизотоп. Флуорофором может быть красный флуоресцентный белок (RFP). RFP может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220.

[11] Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156 или SEQ ID NO: 158 - SEQ ID NO: 165 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156 или SEQ ID NO: 158 - SEQ ID NO: 165, или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156 или SEQ ID NO: 158 - SEQ ID NO: 165, или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию

может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156 или SEQ ID NO: 158 - SEQ ID NO: 165, или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156 или SEQ ID NO: 158 - SEQ ID NO: 165, или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

[12] В настоящем раскрытии представлена фармацевтическая композиция, содержащая: выделенную конструкцию доставки, которая описана в настоящей заявке; и фармацевтически приемлемый носитель. Композицию можно составить для перорального введения, местного введения, легочного введения, интраназального введения, буккального введения, сублингвального введения или введения в глаза. Композицию можно составить для перорального введения. Композицию можно составить в капсуле или таблетке.

[13] В настоящем раскрытии представлен полинуклеотид, который может кодировать выделенную конструкцию доставки, которая описана в настоящей заявке.

[14] В различных аспектах в настоящем раскрытии представлен вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий выделенную конструкцию доставки, которая описана в настоящей заявке.

[15] В настоящем раскрытии представлена клетка-хозяин, которая может содержать вектор, который экспрессирует конструкцию доставки, причем клетка-хозяин содержит вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий выделенную конструкцию доставки, которая описана в настоящей заявке.

[16] В настоящем раскрытии представлен способ доставки гетерологичного груза через эпителиальную клетку, причем способ может включать: нанесение конструкции доставки на апикальную поверхность эпителиальной клетки; и доставку конструкции доставки к базальной стороне эпителиальной клетки со скоростью более 10^{-6} см/сек, причем конструкция доставки содержит: носитель, соединенный с гетерологичным грузом. В некоторых аспектах способ дополнительно включает высвобождение конструкции доставки с базальной стороны эпителиальной клетки после доставки через эпителиальную клетку. В некоторых аспектах носитель выполнен с возможностью доставки гетерологичного груза к базальной стороне эпителиальной клетки.

[17] В настоящем раскрытии представлен способ доставки гетерологичного груза во внутреннюю часть эпителиальной клетки посредством эндоцитоза, причем способ может включать: нанесение конструкции доставки на апикальную поверхность эпителиальной клетки; и доставку конструкции доставки во внутреннюю часть эпителиальной клетки посредством эндоцитоза, причем конструкция доставки содержит: носитель, соединенный с гетерологичным грузом.

[18] В настоящем раскрытии представлен способ доставки гетерологичного груза в

супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки посредством эндоцитоза, причем способ может включать: нанесение конструкции доставки на апикальную поверхность эпителиальной клетки; и доставку конструкции доставки в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки посредством эндоцитоза, причем конструкция доставки содержит: носитель, соединенный с гетерологичным грузом.

[19] В настоящем раскрытии представлен способ взаимодействия с рибофилином 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлеканом или их комбинацией, причем способ может включать: нанесение конструкции доставки на апикальную поверхность эпителиальной клетки; и взаимодействие конструкции доставки с рибофилином 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлеканом или их комбинацией, причем конструкция доставки содержит: носитель, соединенный с гетерологичным грузом. Носитель может взаимодействовать с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана или их комбинацией, и не проявляет взаимодействие с одним или более элементами из клатрина или GPR78 или их комбинацией. Взаимодействие может представлять собой селективное взаимодействие или pH-зависимое взаимодействие или их комбинацию. Взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана может происходить на поверхности эпителиальной клетки, во внутренней части эпителиальной клетки или в их комбинации.

[20] В настоящем раскрытии представлен способ лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ может включать введение субъекту конструкции доставки, содержащей: носитель, соединенный с гетерологичным грузом; причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз во внутреннюю часть эпителиальной клетки.

[21] В настоящем раскрытии представлен способ лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ может включать введение субъекту конструкции доставки, содержащей: носитель, соединенный с гетерологичным грузом; причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки.

[22] В настоящем раскрытии представлен способ диагностики заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ может включать введение субъекту конструкции доставки, содержащей: носитель, соединенный с гетерологичным грузом; причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз во внутреннюю часть эпителиальной клетки.

[23] В настоящем раскрытии представлен способ диагностики заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ может включать введение субъекту конструкции доставки, содержащей: носитель, соединенный с гетерологичным грузом; причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки.

[24] В настоящем раскрытии представлен способ лечения заболевания у

нуждающегося в этом субъекта, причем способ может включать введение субъекту конструкции доставки, содержащей: носитель, полученный из домена I экзотоксина и с отсутствующим доменом II, доменом Ib и доменом III экзотоксина, соединенный с гетерологичным грузом; причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз посредством трансцитоза через эпителиальную клетку.

[25] В настоящем раскрытии представлен способ диагностики заболевания у нуждающегося в этом субъекта, причем способ может включать введение субъекту конструкции доставки, содержащей: носитель, полученный из домена I экзотоксина и с отсутствующим доменом II, доменом Ib и доменом III экзотоксина, соединенный с гетерологичным грузом; причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз посредством трансцитоза через эпителиальную клетку. Доставка гетерологичного груза через эпителиальную клетку может происходить in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки в базолатеральный компартмент. Доставка гетерологичного груза может происходить in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки во внутреннюю часть эпителиальной клетки. Доставка гетерологичного груза может происходить in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки. Взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана или их комбинацией может происходить in vitro на апикальной поверхности эпителиальной клетки, во внутренней части эпителиальной клетки или представляет собой их комбинацию. Эпителиальная клетка может быть поляризованной эпителиальной клеткой. Поляризованная эпителиальная клетка может быть частью монослоя поляризованных эпителиальных клеток. Поляризованная эпителиальная клетка может происходить от грызуна. Поляризованная эпителиальная клетка может происходить от человека. Человеческая поляризованная эпителиальная клетка может быть человеческой поляризованной эпителиальной клеткой кишечника. Человеческая поляризованная эпителиальная клетка кишечника может быть клеткой Caco-2. Доставка гетерологичного груза через эпителиальную клетку может происходить in vivo из кишечника субъекта в базолатеральный компартмент субъекта. Доставка гетерологичного груза может происходить in vivo из кишечника субъекта во внутреннюю часть эпителиальной клетки субъекта. Доставка гетерологичного груза может происходить in vivo из кишечника субъекта в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки субъекта. Взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и перлекана или их комбинацией может происходить in vivo на апикальной поверхности эпителиальной клетки субъекта, во внутренней части эпителиальной клетки субъекта или в их комбинации. Субъектом может быть грызун или человек. Эпителиальная клетка может быть поляризованной эпителиальной клеткой. Поляризованная эпителиальная клетка может быть поляризованной эпителиальной клеткой кишечника. Способ может дополнительно включать составление конструкции доставки для введения субъекту.

Состав может содержать один или более фармацевтически приемлемых носителей. Конструкцию доставки можно составить для перорального введения, местного введения, легочного введения, интраназального введения, буккального введения, сублингвального введения или введения в глаза. Композицию можно составить для перорального введения. Заболеванием может быть воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, рак, нарушение обмена веществ, жировая болезнь печени или нарушение роста из-за дефицита гормона роста. Воспалительным заболеванием может быть воспалительное заболевание кишечника, псориаз или бактериальный сепсис. Воспалительным заболеванием кишечника может быть болезнь Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, синдром Бехчета или неопределенный колит. Аутоиммунным заболеванием может быть системная красная волчанка (SLE), вульгарная пузырчатка, миастения гравис, гемолитическая анемия, тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Грейвса, болезнь Шегрена, дерматомиозит, болезнь Хашимото, полимиозит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз (MS), сахарный диабет, ревматоидный артрит или склеродермия. Раком может быть неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, хроническая лимфоцитарная лейкемия, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественная миелома, карцинома мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки, злокачественная меланома, резистентная к ритуксимабу NHL или лейкемия. Нарушением обмена веществ может быть диабет, ожирение, диабет вследствие ожирения, гипергликемия, дислипидемия, гипертриглицеридемия, синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическая дислипидемия или гиперлипидемия. Носителем может быть малая молекула. Носителем может быть полипептид. Полипептид может представлять собой антитело или его функциональный фрагмент. Носителем может быть аптамер. Носитель можно получить из экзотоксина. Носитель может быть получен из домена I экзотоксина и не имеет домена II, домена Ib и домена III экзотоксина. Носитель можно получить из домена I экзотоксина и содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью домена I экзотоксина или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, причем экзотоксин представляет собой токсин Cholix или экзотоксин A Pseudomonas. Носитель может содержать по меньшей мере 130 аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 150 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель, у которого отсутствует домен II и домен III экзотоксина, может содержать часть домена II или домена III экзотоксина или их комбинацию. Часть содержит не более 82 аминокислотных остатков домена II или домена III экзотоксина. Экзотоксином может быть токсин Cholix. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 80% идентичность

последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать: аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или ее функциональный фрагмент. В некоторых аспектах носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-187 или 1-206 SEQ ID NO: 5 или один или более аминокислотных остатков 1-186 или 1-205 SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать остатки 1-187 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-186 SEQ ID NO: 4 и не более 206 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей

с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-151 или 1-187 SEQ ID NO: 5 или одного или более аминокислотных остатков 1-150 или 1-186 SEQ ID NO: 4. У носителя могут отсутствовать любые один или более аминокислотных остатков 1-39 SEQ ID NO: 5 или остатков 1-38 SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать остатки 1-151 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-150 SEQ ID NO: 4 и не более 187 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-151 SEQ ID NO: 5 или одного или более аминокислотных остатков 1-150 SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать остатки 1-134 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-133 SEQ ID NO: 4 и не более 151 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 106 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать по меньшей мере одну, но не более 20 бета цепей. Экзотоксином может быть экзотоксин A Pseudomonas. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:

137 или по меньшей мере 80% идентичность с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-252 SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать остатки 1-252 SEQ ID NO: 135. Носитель может содержать первую часть и вторую часть, причем первую часть получают из первого экзотоксина, а вторую часть получают из второго экзотоксина. Первым экзотоксином может быть Cholix, а вторым экзотоксином может быть PE. Первую часть можно получить из домена I, домена II, домена Ib или домена III Cholix или любых их комбинаций. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Вторую часть можно получить из домена I, домена II, домена Ib или домена III PE или любых их комбинаций. Вторая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 145, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первую часть можно химически соединить или рекомбинантно соединить со второй частью. Первую часть можно прямо или непрямо соединить со второй частью. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 146 или SEQ

ID NO: 147. Носитель может дополнительно содержать по меньшей мере один N-концевой метиониновый остаток. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки может образовать мультимер. Мультимер может быть образован путем мультимеризации гетерологичного груза. Мультимером может быть гетеромер или гомомер. Гомомер может представлять собой гомодимер. Гомодимер может быть образован путем димеризации гетерологичного груза. Носитель можно химически соединить или рекомбинантно соединить с гетерологичным грузом. Носитель можно ковалентно соединить с гетерологичным грузом. Гетерологичный груз можно соединить с С-концом носителя. Гетерологичный груз можно соединить с N-концом носителя. Носитель можно соединить прямо с гетерологичным грузом. Носитель можно соединить непрямо с гетерологичным грузом. Носитель можно соединить с гетерологичным грузом посредством спейсера. Спейсер может содержать аминокислотный спейсер. Аминокислотный спейсер может содержать один или более глициновых остатков и один или более сериновых остатков. Аминокислотный спейсер может иметь от 1 до 50 аминокислотных остатков в длину. Спейсером может быть расщепляемый спейсер. Расщепляемый спейсер может содержать аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 174 - SEQ ID NO: 206. Спейсером может быть нерасщепляемый спейсер. Нерасщепляемый спейсер может содержать одну или несколько аминокислотных последовательностей GTGGS (SEQ ID NO: 207), GGGGS (SEQ ID NO: 208), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 209), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210) или GGGGSGGG (SEQ ID NO: 211). Нерасщепляемый спейсер может содержать один или более $(GGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 212), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Нерасщепляемый спейсер может содержать одну или несколько $(GS)_x$ (SEQ ID NO: 213), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Спейсер может содержать один или более фрагментов домена II, домена Ib или домена III экзотоксина или их комбинацию. Спейсер может содержать не более 82 аминокислотных остатков домена II, 82 аминокислотных остатков домена III или их комбинацию. Гетерологичным грузом может быть макромолекула, малая молекула, полипептид, нуклеиновая кислота, мРНК, микроРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловая молекула, антитело, ДНК, плазмида, вакцина, полимер, наночастица или каталитически активный материал. Гетерологичным грузом может быть биологически активный груз. Биологически активным грузом может быть цитокин, гормон, терапевтическое антитело, его функциональный фрагмент или любые их комбинации. Цитокином может быть IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29 или IL-30. Цитокин может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или SEQ ID NO: 218. Гормон может иметь

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или SEQ ID NO: 216. терапевтическим антителом может быть антитело против TNFa. Антителом против TNFa может быть адалимумаб или инфликсимаб. Гетерологичным грузом может быть обнаруживаемое средство. Обнаруживаемым средством может быть флуорофор, контрастное средство, рентгеноконтрастное средство, PET средство, наночастица или радиоизотоп. Флуорофором может быть красный флуоресцентный белок (RFP). RFP может иметь аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220.

[26] Настоящее раскрытие относится к новым не встречающимся в природе конструкциям доставки, которые могут содержать полученный из бактериальных токсинов химерный носитель, соединенный с биологически активным грузом; причем химерный носитель получен из домена I, но не содержит домен II, домен Ib или домен III бактериального токсина (например, экзотоксина); и при этом конструкция доставки способна доставлять гетерологичный (например, биологически активный) груз посредством трансцитозной транспортировки через эпителиальную клетку (например, эпителиальную клетку кишечника).

[27] Носитель может происходить из домена I экзотоксина и способен распознавать и взаимодействовать с одним или более рецепторами на просветной (например, апикальной) поверхности эпителиальных клеток кишечника. Рецептор может быть селективным или неселективным. В некоторых аспектах рецептор, с которым взаимодействует носитель, представляет собой неселективный скэвенджер-рецептор или трансмембранный рецептор 132 (TMEM132). Взаимодействие конструкций доставки с рецептором клеточной поверхности, который находится на апикальной мембране поляризованной эпителиальной клетки, может происходить с достаточной аффинностью, чтобы обеспечить эндоцитоз конструкции доставки. Носитель, из которого состоит конструкция доставки согласно настоящему раскрытию, может связываться с рецептором (рецепторами), который, как известно специалисту в данной области, присутствует на апикальной мембране эпителиальной клетки без ограничения. В разных вариантах осуществления рецепторсвязывающий домен конструкции доставки может связываться с белком 1, связанным с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP1), или рецептором TMEM132.

[28] Конструкция доставки, которая описана в настоящей заявке, может быть способна доставлять гетерологичный (например, биологически активный) груз через эпителиальную клетку с апикальной стороны в базолатеральный компартмент и/или собственную пластинку. Конструкция доставки, которая описана в настоящей заявке, может быть способна доставлять гетерологичный (например, биологически активный) груз в эпителиальную клетку (например, поляризованную эпителиальную клетку кишечника), такую как внутриклеточная везикула или компартмент или цитозоль эпителиальной клетки, обеспечивая таким образом накопление гетерологичного (например, биологически активного) груза в эпителиальной клетке. Носитель можно получить из домена I экзотоксина, выбираемого из группы, состоящей из носителя cholix

(Cholix) и экзотоксина A Pseudomonas (PE).

[29] Носителем может быть полипептид, полученный из Cholix и/или PE и имеющий: не более 5 аминокислотных остатков; не более 10 аминокислотных остатков; не более 15 аминокислотных остатков; не более 20 аминокислотных остатков; не более 30 аминокислотных остатков; не более 40 аминокислотных остатков; не более 50 аминокислотных остатков; не более 60 аминокислотных остатков; не более 70 аминокислотных остатков; не более 80 аминокислотных остатков; не более 90 аминокислотных остатков; не более 100 аминокислотных остатков; не более 110 аминокислотных остатков; не более 120 аминокислотных остатков; не более 130 аминокислотных остатков; не более 140 аминокислотных остатков; не более 150 аминокислотных остатков; не более 160 аминокислотных остатков; не более 170 аминокислотных остатков; не более 180 аминокислотных остатков; не более 190 аминокислотных остатков; не более 200 аминокислотных остатков; не более 210 аминокислотных остатков; не более 220 аминокислотных остатков; не более 230 аминокислотных остатков; не более 240 аминокислотных остатков; не более 250 аминокислотных остатков; не более 260 аминокислотных остатков; и не более 265 аминокислотных остатков.

[30] Носитель может быть получен из домена I экзотоксина Cholix и может содержать аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, имеющей более 50% гомологию с SEQ ID NO: 4, имеющей более 60% гомологию с SEQ ID NO: 4, имеющей более 70% гомологию с SEQ ID NO: 4, имеющей более 80% гомологию с SEQ ID NO: 4, имеющей более 85% гомологию с SEQ ID NO: 4, имеющей более 90% гомологию с SEQ ID NO: 4 и имеющий более 95% гомологию с SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях конструкция доставки получена из экзотоксина cholix (Cholix) и содержит полипептид рецепторсвязывающего домена, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 90% гомологией с SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 95% гомологией с SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, в котором один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 4 заменены другой аминокислотой. Носитель может содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, который представляет собой усеченную часть аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

[31] Носитель может быть получен из домена I экзотоксина A Pseudomonas (PE) и может содержать полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. Конструкция доставки может содержать аминокислотную последовательность с более 90% гомологией с SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 95% гомологией с SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, в котором один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 137 заменены другой аминокислотой. Носитель

может содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, который представляет собой усеченную часть аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 137.

[32] Конструкция доставки может содержать носитель, причем носитель содержит один или более аминокислотных остатков домена I одного экзотоксина (например, домена I Cholix или PE), замененных одним или более аминокислотными остатками домена I второго экзотоксина (например, домена I Cholix или PE) (также упоминаемый в настоящей заявке как гибридный или химерный носитель). Носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 4 заменены одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 137 заменены одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой аминокислотные остатки 77-87 SEQ ID NO: 4 заменены аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой аминокислотные остатки 188-236 SEQ ID NO: 4 заменены аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой аминокислотные остатки 69-71 SEQ ID NO: 137 заменены аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой аминокислотные остатки 177-228 SEQ ID NO: 137 заменены аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя.

[33] Носитель согласно настоящему раскрытию, который может быть получен из домена I экзотоксина и может дополнительно содержать часть домена II, часть домена Ib и/или часть домена III того же или другого экзотоксина. Таким образом, носитель может содержать домен I экзотоксина или его усеченный и/или модифицированный вариант и одну или несколько частей, полученных из домена II, домена Ib и/или домена III того же или другого экзотоксина. Домен II или модифицированный домен II и домен III или модифицированный домен III можно получить из одного и того же бактериального токсина. Домен II или модифицированный домен II и домен III или модифицированный домен III можно получить из бактериального носителя, выбираемого из группы, состоящей из носителя cholix (Cholix) и экзотоксина A Pseudomonas (PE), ботулотоксина, дифтерийного токсина, коклюшного токсина, холерного токсина, термолабильного энтеротоксина E. coli, токсина шига и шигаподобного токсина. Токсичность бактериального носителя (например, Cholix или PE) может не требоваться для транспортировки через эпителиальные слои, такие как эпителий кишечника. Например, конструкция доставки, которая описана в настоящей заявке, может содержать носитель, соединенный с гетерологичным грузом, и при этом носитель получен из домена I Cholix

(например, имеющего аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125), и дополнительно содержит части домена II (например, SEQ ID NO: 126 или SEQ ID NO: 138), домена Ib (например, SEQ ID NO: 127 или SEQ ID NO: 139) и/или домена III (например, SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 140) экзотоксина (например, Cholix и/или PE).

[34] Конструкция доставки может содержать носитель, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 4, транслокационный домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 126, и нетоксичный каталитический домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 128. Конструкции доставки могут содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, имеющего аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 136, транслокационный домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 137, и нетоксичный каталитический домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 139. Конструкция доставки может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 146. В разных вариантах осуществления конструкция доставки содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 147.

[35] Конструкции доставки согласно настоящему раскрытию могут содержать носитель, соединенный с гетерологичным грузом. Гетерологичным грузом может быть биологически активный груз. Гетерологичным грузом может быть обнаруживаемое средство. Носитель можно соединить с биологически активным грузом для получения конструкции доставки, которая способна доставлять биологически активный груз посредством трансцитозной транспортировки через эпителий кишечника. Биологически активный груз можно выбрать, например, из макромолекулы, малой молекулы, пептида, полипептида, нуклеиновой кислоты, мРНК, микроРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловой молекулы, антитела, ДНК, плазмиды, вакцины, полимерной наночастицы или каталитически активного материала. Биологически активным грузом может быть фермент, выбираемый из гиалуронидазы, стрептокиназы, тканевого активатора плазминогена, урокиназы или PGE-аденозиндезаминазы. Биологически активный груз может содержать аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 214, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 217, SEQ ID NO: 218 и SEQ ID NO: 219 или любых их комбинаций.

[36] Конструкции доставки могут содержать носитель, прямо соединенный с гетерологичным (например, биологически активным) грузом. Гетерологичный (например, биологически активный) груз можно прямо соединить с С-концом конструкции доставки. Гетерологичный (например, биологически активный) груз можно прямо соединить с N-концом конструкции доставки.

[37] Конструкции доставки могут содержать носитель, химически соединенный с

гетерологичным (например, биологически активным) грузом. Конструкции доставки могут содержать носитель, рекомбинантно соединенный с гетерологичным (например, биологически активным) грузом. Конструкцию доставки согласно настоящему раскрытию можно получить частично синтетически (например, посредством твердофазного синтеза) или рекомбинантно (например, экспрессировать бактериально (например, E. coli) или в клетке млекопитающего (например, в клетке CHO)). Конструкцию доставки согласно настоящему раскрытию можно получить частично синтетически и частично рекомбинантно.

[38] Конструкции доставки могут включать в себя конструкцию доставки, соединенную с биологически активным грузом расщепляемым спейсером. Спейсер может расщепляться ферментом, который находится на базолатеральной мембране поляризованной эпителиальной клетки. Спейсер может расщепляться ферментом, который находится в плазме. Расщепляемый спейсер может содержать аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 174 - SEQ ID NO: 206. Расщепляемый спейсер может представлять собой спейсер, который содержит аминокислотную последовательность, которая может представлять собой известный субстрат для протеазы вируса гравировки табака (TEV). Расщепляемый спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193. Спейсер может расщепляться ферментом, который находится на базолатеральной мембране поляризованной эпителиальной клетки. Спейсер может расщепляться ферментом, который находится в плазме субъекта.

[39] Расщепляемые спейсеры могут содержать пептидную последовательность (и похожий домен), которая служит для ингибирования, создания помехи или блокирования способности биологически активного груза связываться с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток, но при этом конструкция доставки сохраняет способность груза активировать свой рецептор после транспортировки конструкции доставки через эпителиальный барьер и высвобождения груза из конструкции доставки и спейсерных компонентов конструкции. Расщепляемый спейсер может содержать аминокислотную последовательность, например, по SEQ ID NO: 194 - SEQ ID NO: 206.

[40] Настоящее раскрытие также относится к фармацевтическим композициям, которые могут содержать новую не существующую в природе конструкцию доставки согласно настоящему раскрытию и один или более фармацевтически приемлемых носителей, составленных для перорального введения, местного введения, легочного введения, интраназального введения, буккального введения, сублингвального введения или введения в глаза.

[41] В настоящем раскрытии представлен способ лечения воспалительного заболевания у субъекта, который может включать введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. В разных вариантах осуществления воспалительное заболевание выбирают из воспалительного заболевания кишечника, псориаза или бактериального сепсиса. В разных вариантах осуществления воспалительным заболеванием кишечника является болезнь Крона, язвенный колит,

коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, синдром Бехчета или неопределенный колит.

[42] В настоящем раскрытии представлен способ лечения аутоиммунного заболевания у субъекта, который может включать введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. В разных вариантах осуществления аутоиммунным заболеванием является системная красная волчанка (SLE), вульгарная пузырчатка, миастения гравис, гемолитическая анемия, тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Грейвса, болезнь Шегрена, дерматомиозит, болезнь Хашимото, полимиозит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз (MS), сахарный диабет, ревматоидный артрит или склеродермия.

[43] В настоящем раскрытии представлен способ лечения рака у субъекта, который может включать введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. В разных вариантах осуществления подлежащий лечению рак включает, но без ограничения, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, хроническую лимфоцитарную лейкемию, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественную миелому, карциному мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки, злокачественную меланому и резистентную к ритуксимабу NHL и лейкемию.

[44] В настоящем раскрытии представлен способ лечения субъекта с нарушением обмена веществ, причем указанный способ может включать введение фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию в количестве, достаточном для лечения указанного расстройства, причем указанным нарушением обмена веществ является диабет, ожирение, диабет вследствие ожирения, гипергликемия, дислипидемия, гипертриглицеридемия, синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическая дислипидемия или гиперлипидемия.

[45] В настоящем раскрытии представлен способ лечения субъекта, имеющего жировую болезнь печени (например, неалкогольную жировую болезнь печени (NAFLD); неалкогольный стеатогепатит (NASH)), желудочно-кишечное заболевание или нейродегенеративное заболевание, причем указанный способ включает пероральное введение фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию в количестве, достаточном для лечения указанного заболевания.

[46] В настоящем раскрытии представлен способ лечения субъекта с нарушением роста при дефиците GH, причем указанный способ может включать введение фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию в количестве, достаточном для лечения указанного расстройства, причем указанным расстройством является дефицит гормона роста (GHD), синдром Тернера (TS), синдром Нунан, синдром Прадера-Вилли, дефицит гомеобокс-содержащего гена низкого роста (SHOX), хроническая почечная недостаточность и синдром короткой кишки с идиопатической низкорослостью, дефицит GH из-за редких опухолей гипофиза или их лечения и болезнь истощения мышечной ткани, связанного с HIV/AIDS.

[47] Конструкция доставки может содержать носитель, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 133 или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 147. Конструкция доставки может содержать носитель, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с любой одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 133 или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 147. Конструкция доставки может содержать носитель, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с любой одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 133 или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 147. Конструкция доставки может содержать носитель, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с любой одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 133 или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 147. Носитель может быть получен из домена I Cholix и может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 и/или SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель может быть получен из домена I Cholix и может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с любой одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 и/или SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель может быть получен из домена I Cholix и может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с любой одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 и/или SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель может быть получен из домена I Cholix и может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с любой одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 и/или SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Любой из этих носителей можно комбинировать с любым гетерологичным грузом, описанным и раскрытым в настоящей заявке, например, те, что имеют по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220. Любой из этих носителей можно комбинировать с любым гетерологичным грузом, описанным и раскрытым в настоящей заявке, например, те, что имеют по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220. Любой из этих носителей можно комбинировать с любым гетерологичным грузом, описанным и раскрытым в настоящей заявке, например, те, что имеют по меньшей мере

95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220. Любой из этих носителей можно комбинировать с любым гетерологичным грузом, описанным и раскрытым в настоящей заявке, например, те, что имеют по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220. Конструкция доставки, описанная в настоящей заявке, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165. Конструкция доставки, описанная в настоящей заявке, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165. Конструкция доставки, описанная в настоящей заявке, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165. Конструкция доставки, описанная в настоящей заявке, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165. Конструкция может быть способна к эндоцитозу (например, к апикальному эндоцитозу). Конструкция может быть способна к апикально-базальному трансцитозу.

[48] В настоящем раскрытии представлены выделенные конструкции доставки, которые могут быть способны связывать рецептор на просветной поверхности эпителиальных клеток кишечника с достаточной аффинностью, чтобы обеспечить эндоцитоз; причем домен представляет собой полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков полипептида домена I одного бактериального токсина заменены одним или более аминокислотными остатками полипептида домена I второго бактериального токсина (например, экзотоксина). Домен I первого экзотоксина может содержать полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 4 можно заменить одним или более аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального токсина (например, экзотоксина). Рецепторсвязывающим доменом может быть полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 4 заменены одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 137. Рецепторсвязывающим доменом может быть полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 137 заменены одним или более аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального токсина. Рецепторсвязывающим доменом может быть полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 136 заменены одним или более аминокислотными

остатками SEQ ID NO: 4. химерный носитель может содержать биологически активный груз, соединенный с полипептидом для получения химерной конструкции; причем химерная конструкция способна доставлять биологически активный груз.

[49] В настоящем раскрытии представлена химерная конструкция, содержащая полученную из бактериальных токсинов конструкцию доставки; и биологически активный груз; причем конструкция доставки способна доставлять биологически активный груз в эпителиальную клетку; и при этом конструкция доставки не содержит полученного из бактериальных токсинов транслокационного домена или полученного из бактериальных токсинов каталитического (цитотоксического) домена. В настоящем раскрытии представлена химерная конструкция, состоящая из рецепторсвязывающего домена бактериального токсина; и биологически активного груза; причем конструкция доставки способна доставлять биологически активный груз в эпителиальную клетку, и при этом химерная конструкция способна связывать рецептор на просветной поверхности эпителиальных клеток кишечника.

[50] В настоящем раскрытии дополнительно представлены полинуклеотиды, которые кодируют не существующие в природе конструкции доставки и/или конструкции доставки согласно настоящему раскрытию; векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие не существующие в природе конструкции доставки и/или конструкции доставки согласно настоящему раскрытию; необязательно, функционально связанные с контрольными последовательностями, распознаваемыми клеткой-хозяином, трансформированной вектором; клетки-хозяева, содержащие векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие не существующие в природе конструкции доставки и/или конструкции доставки согласно настоящему раскрытию; способ получения не существующих в природе конструкций доставки и/или конструкций доставки согласно настоящему раскрытию, включающий культивирование клеток-хозяев, содержащих векторы, содержащие полинуклеотиды, кодирующие не существующие в природе конструкции доставки и/или конструкции доставки согласно настоящему раскрытию, таким образом, чтобы экспрессировать полинуклеотид; и, необязательно, извлечение не существующих в природе конструкций доставки и/или конструкций доставки из культуральной среды клеток-хозяев.

[51] В настоящей заявке раскрыто применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

[52] В настоящей заявке раскрыто применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

[53] В настоящей заявке раскрыто применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного

средства для лечения, профилактики и/или предотвращения рака у нуждающегося в этом субъекта.

[54] В настоящей заявке раскрыто применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения нарушения обмена веществ у нуждающегося в этом субъекта.

[55] В настоящей заявке раскрыто применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения жировой болезни печени у нуждающегося в этом субъекта.

[56] В настоящей заявке раскрыто применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения нарушения роста из-за дефицита GH у нуждающегося в этом субъекта.

Краткое описание чертежей

[57] Новые признаки согласно настоящему раскрытию подробно изложены в приложенной формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего раскрытия будет получено посредством ссылки на следующее подробное описание, в котором изложены иллюстративные аспекты, в которых использованы принципы раскрытия, и сопровождающие чертежи (также «фигуры» и «ФИГ.» в настоящей заявке), на которых:

[58] **на фиг. 1** и **на фиг. 2** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкций 7-12 (полученных, как описано в примере **1** в настоящей заявке), наблюдаемое через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции. На **фиг. 1** представлена (сверху вниз) локализация конструкций 12, 11 и 10. На **фиг. 2** представлены (сверху вниз) конструкции 9, 8 и 7. Слева направо: флуоресцентное изображение, темнопольное освещение, комбинация флуоресцентного изображения и темнопольного освещения (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[59] На **фиг. 1A** представлена локализация (флуоресцентное изображение) конструкции 12, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[60] На **фиг. 1B** представлена локализация (изображение в белом свете) конструкции 12, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[61] На **фиг. 1C** представлена локализация (объединенное изображение, с DAPI) конструкции 12, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[62] На **фиг. 1D** представлена локализация (флуоресцентное изображение) конструкции 11, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с

использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[63] На **фиг. 1E** представлена локализация (изображение в белом свете) конструкции 11, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[64] На **фиг. 1F** представлена локализация (объединенное изображение, с DAPI) конструкции 11, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[65] На **фиг. 1G** представлена локализация (флуоресцентное изображение) конструкции 10, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[66] На **фиг. 1H** представлена локализация (изображение в белом свете) конструкции 10, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[67] На **фиг. 1I** представлена локализация (объединенное изображение, с DAPI) конструкции 10, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[68] На **фиг. 2A** представлена локализация (флуоресцентное изображение) конструкции 9, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[69] На **фиг. 2B** представлена локализация (изображение в белом свете) конструкции 9, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[70] На **фиг. 2C** представлена локализация (объединенное изображение, с DAPI) конструкции 9, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[71] На **фиг. 2D** представлена локализация (флуоресцентное изображение) конструкции 8, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[72] На **фиг. 2E** представлена локализация (изображение в белом свете) конструкции 8, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[73] На **фиг. 2F** представлена локализация (объединенное изображение, с DAPI) конструкции 8, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[74] На **фиг. 2G** представлена локализация (флуоресцентное изображение) конструкции 7, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[75] На **фиг. 2H** представлена локализация (изображение в белом свете) конструкции 7, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[76] На **фиг. 2I** представлена локализация (объединенное изображение, с DAPI) конструкции 7, наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[77] На **фиг. 3** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 6 (полученной, как описано в примере **1** в настоящей заявке), наблюдаемой через 20 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции. Слева направо: флуоресцентное изображение, темнопольное освещение, комбинация флуоресцентного изображения и темнопольного освещения (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[78] На **фиг. 3A** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 6 (anti-Cho, 1/500).

[79] На **фиг. 3B** представлено обнаружение при темнопольном освещении конструкции 6 (anti-Cho, 1/500).

[80] На **фиг. 3B** представлено обнаружение при комбинации флуоресцентного изображения и темнопольного освещения конструкции 6 (anti-Cho, 1/500).

[81] На **фиг. 3D** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 6 (anti-RPF, 1/50).

[82] На **фиг. 3E** представлено обнаружение при темнопольном освещении конструкции 6 (anti-RPF, 1/50).

[83] На **фиг. 3F** представлено обнаружение при комбинации флуоресцентного изображения и темнопольного освещения конструкции 6 (anti-RPF, 1/50).

[84] На **фиг. 4** и **на фиг. 5** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 (SEQ ID NO: 146, полученной, как описано в примере **5** в настоящей заявке), наблюдаемое через 1 мин (фиг. **4**) и 20 мин (фиг. **5**) после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[85] На **фиг. 4A** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 1 мин.

[86] На **фиг. 4B** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 1 мин.

[87] На **фиг. 4C** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 1 мин.

[88] На **фиг. 4D** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 1 мин.

[89] На **фиг. 4E** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 1 мин (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[90] На **фиг. 5A** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 20 мин.

[91] На **фиг. 5B** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 20 мин.

[92] На **фиг. 5C** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 20 мин.

[93] На **фиг. 5D** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 через 20 мин.

[94] На **фиг. 5E** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 13 после 20 мин (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[95] На **фиг. 6** и **на фиг. 7** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 (SEQ ID NO: 147, полученной, как описано в примере **5** в настоящей заявке), наблюдаемое через 1 мин (фиг. **6**) и 20 мин (фиг. **7**) после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[96] На **фиг. 6A** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 1 мин.

[97] На **фиг. 6B** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 1 мин.

[98] На **фиг. 6C** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 1 мин.

[99] На **фиг. 6D** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 1 мин.

[100] На **фиг. 6E** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 1 мин (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[101] На **фиг. 7A** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 20 мин.

[102] На **фиг. 7B** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 20 мин.

[103] На **фиг. 7C** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 20 мин.

[104] На **фиг. 7D** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 через 20 мин.

[105] На **фиг. 7E** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции 14 после 20 мин (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[106] На **фиг. 8A** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165 (M+Cholix$^{39\text{-}186}$-(спейсер с SEQ ID NO: 210)-HGH), наблюдаемое через 5 мин после

внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[107] На **фиг. 8B** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165 (M+Cholix$^{39-186}$-(спейсер с SEQ ID NO: 210)-HGH), наблюдаемое через 10 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[108] На **фиг. 8C** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165 (M+Cholix$^{39-186}$-(спейсер с SEQ ID NO: 210)-HGH), наблюдаемое через 15 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[109] На **фиг. 9A** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160 (Cholix$^{1-187}$-(спейсер с SEQ ID NO: 210)-HGH), наблюдаемое через 5 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[110] На **фиг. 9B** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160 (Cholix$^{1-187}$-(спейсер с SEQ ID NO: 210)-HGH), наблюдаемое через 10 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции.

[111] На **фиг. 9C** представлено обнаружение с помощью флуоресцентного микроскопа конструкции, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 160 (Cholix$^{1-187}$-(спейсер с SEQ ID NO: 210)-HGH), наблюдаемое через 15 мин после внутрипросветной инъекции с использованием крысиной модели внутрипросветной инъекции (белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[112] На **фиг. 10A** представлен трансцитоз посредством нетоксичного Cholix (ntChx) через человеческий поляризованный эпителий кишечника in vitro. На **фиг. 10A** представлено количество нетоксичного Cholix (ntChx, SEQ ID NO: 3), обнаруженное в базальном компартменте с помощью ELISA через 2 ч после апикального применения 2,5-200 мг/мл ntChx (N=2; среднее значение ± S.E. Белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[113] На **фиг. 10B** представлен анализ Western blot содержимого базального компартмента через 2 ч после апикального применения 2,5-200 мг/мл ntChx, концентрацию которого увеличили приблизительно в 10 раз перед анализом, показывающий, что транспортируемый ntChx существенно не изменился (например, не изменился химически) во время транспортировки.

[114] На **фиг. 10C** представлены базальные количества ntChx, обнаруженные в течение 2 ч с помощью ELISA. На графике показана задержка ~20-25 мин обнаруживаемых количеств и сравнимые скорости транспортировки для апикальных применений 5-20 мг/мл при 37°C, и значительное снижение скорости транспортировки при 4°C.

[115] На **фиг. 11** показано, что апикально-базальная транспортировка 5-20 мг/мл ntChx (SEQ ID NO: 3), которую измеряют с помощью ELISA, была более эффективной при pH 7 апикального компартмента по сравнению с pH 5 (N=2; среднее значение ± S.E).

[116] На **фиг. 12A** представлен трансцитоз нетоксичного Cholix (ntChx, SEQ ID NO: 3) in vivo через 1 минуту после внутрипросветной инъекции (ILI) в тощую кишку крысы, визуализированный с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. Открытая стрелка=апикальный домен энтероцитов; сплошная стрелка=перинуклеарная область клетки; пунктирная линия=разграничение эпителиальных клеток-базальной мембраны; GC=бокаловидная клетка.

[117] На **фиг. 12B** представлен трансцитоз нетоксичного Cholix (ntChx, SEQ ID NO: 3) in vivo через 5 минут после ILI в тощую кишку крысы, визуализированный с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. Открытая стрелка=апикальный домен энтероцитов; сплошная стрелка=перинуклеарная область клетки; пунктирная линия=разграничение эпителиальных клеток-базальной мембраны; GC=бокаловидная клетка.

[118] На **фиг. 12C** представлен трансцитоз нетоксичного Cholix (ntChx, SEQ ID NO: 3) in vivo через 15 минут после ILI в тощую кишку крысы, визуализированный с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. Совместная локализация с клатрином показывает зону кончиков ворсинок. Открытая стрелка=апикальный домен энтероцитов; сплошная стрелка=перинуклеарная область клетки; пунктирная линия=разграничение эпителиальных клеток-базальной мембраны; GC=бокаловидная клетка.

[119] На **фиг. 13A** представлен трансцитоз in vivo ntChx через 15 мин после ILI ntChx (SEQ ID NO: 3) в тощую кишку крысы с одновременным окрашиванием раннего эндосомного антигена 1 (EEA1) (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность). GC=бокаловидная клетка; l-p=собственная пластинка.

[120] На **фиг. 13B** представлен трансцитоз in vivo ntChx через 15 мин после ILI ntChx (SEQ ID NO: 3) в тощую кишку крысы с одновременным окрашиванием Ras-связанного белка Rab 11a (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность). GC=бокаловидная клетка; l-p=собственная пластинка.

[121] На **фиг. 13C** представлен трансцитоз in vivo ntChx через 15 мин после ILI ntChx (SEQ ID NO: 3) в тощую кишку крысы с одновременным окрашиванием транс-сети Гольджи (TGN)-белка 38.

[122] На фиг. 13D представлен трансцитоз in vivo ntChx через 15 мин после ILI

ntChx (SEQ ID NO: 3) в тощую кишку крысы с одновременным окрашиванием калнексином (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность). GC=бокаловидная клетка; l-p=собственная пластинка.

[123] На **фиг. 13E** представлен трансцитоз in vivo ntChx через 15 мин после ILI ntChx (SEQ ID NO: 3) в тощую кишку крысы с одновременным окрашиванием Ras-связанного белка Rab 7 (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность). GC=бокаловидная клетка; l-p=собственная пластинка.

[124] На **фиг. 13F** представлен трансцитоз in vivo ntChx через 15 мин после ILI ntChx (SEQ ID NO: 3) в тощую кишку крысы с одновременным окрашиванием Гольджи-связанного 58 кДа белка формиминотрансферазы-циклодезаминазы (FTCD). GC=бокаловидная клетка; l-p=собственная пластинка.

[125] На **фиг. 14A** представлены небольшие количества RFP (отрицательный контроль), достигающего клеток в собственной пластинке (l-p) без обнаруживаемого RFP в эпителии ворсинок (сплошные стрелки указывают на апикальную поверхность эпителия) через 30 минут после ILI. Поликлональное антитело против RFP демонстрирует, что небольшие количества RFP могут достигать клеток в собственной пластинке (l-p) без обнаруживаемого RFP в эпителии ворсинок; (сплошные стрелки указывают на апикальную поверхность эпителия) через 30 минут после ILI. Сплошная стрелка (#1) = просветная (апикальная) мембрана; белая стрелка #2=базальная мембрана; GC=бокаловидная клетка; l-p=собственная пластинка.

[126] На **фиг. 14B** показано, что конструкция, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157, содержащую полноразмерный нетоксичный Cholix (ntChx, SEQ ID NO: 3), генетически слитый или конъюгированный с красным флуоресцентным белком (RFP, SEQ ID NO: 220), способна к эффективному апикально-базальному трансцитозу. Сплошная стрелка (#1) = просветная (апикальная) мембрана; белая стрелка #2=базальная мембрана; GC=бокаловидная клетка; l-p=собственная пластинка. Полноразмерный нетоксичный Cholix (ntChx, SEQ ID NO: 3) был генетически связан с красным флуоресцентным белком (RFP, SEQ ID NO: 220).

[127] На **фиг. 14C** показано, что домена I Cholix достаточно для апикально-базального трансцитоза после внутрипросветной инъекции (ILI) в тощую кишку крысы in vivo. На **фиг. 14C** показано, что Cholix, усеченный на конце домена I (аминокислотный остаток 265 SEQ ID NO: 1, плюс N-концевой метиониновый остаток, приводящий к SEQ ID NO: 5) и который генетически слит с RFP (например, таким образом, имея аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 156) способен к эффективному апикально-базальному трансцитозу, что позволяет предположить, что домена I Cholix может быть достаточно для апикально-базального трансцитоза после внутрипросветной инъекции (ILI) в тощую кишку крысы in vivo. Сплошные белые стрелки #1 обозначают апикальную поверхность эпителия, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность. Домен I Cholix (SEQ ID NO: 5) был генетически связан с красным флуоресцентным

белком (RFP, SEQ ID NO: 220).

[128] На **фиг. 15** представлена апикально-базальная транспортировка человеческого гормона роста (HGH, SEQ ID NO: 214) по сравнению с химерами домена I Cholix и усеченными элементами этого домена (обозначенными аминокислотами), которые были генетически связаны с HGH. С помощью вестерн блоттинга на HGH качественно оценивали способность этих белков подвергаться апикально-базальной транспортировке через поляризованные монослои первичных эпителиальных клеток тонкого кишечника человека in vitro через 2 ч. Количества примененных апикально материалов были эквивалентны по содержанию HGH на молярной основе, а базальные группы были более концентрированными ~в 10 раз перед анализом.

[129] На **фиг. 15A** показано, что фоновая апикально-базальная транспортировка только HGH в этой модели была минимальной по сравнению с тем, что наблюдалось для конструкции доставки, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 164, содержащую домен I Cholix (SEQ ID NO: 5), спейсер (SEQ ID NO: 210) и HGH (SEQ ID NO: 214). усечения домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) в позициях 134, 151, 187 или в 40-187 SEQ ID NO: 5 были неспособны облегчить апикально-базальную транспортировку связанного HGH.

[130] На **фиг. 15B** показано, что при усечениях домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) в позициях 206, 245 или 251 наблюдалась апикально-базальная транспортировка связанного HGH. Хотя усечения в виде позиций 245 и 251 привели к апикально-базальной транспортировке, сопоставимой с транспортировкой конструкции, содержащей носитель с SEQ ID NO: 5, химера, в которой домен I Cholix усечен в позиции 206 показала значительное усиление апикально-базальной транспортировки.

[131] На **фиг. 16A** представлена оценка транспортировки химеры усечение домена I Cholix - гормон роста человека (HGH) через монослои эпителия тощей кишки крысы in vivo через 15 мин после внутрипросветной инъекции, продемонстрированная с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. На **фиг. 16A** показано, что конструкция Cholix-HGH с SEQ ID NO: 211 (содержит $Cholix^{1-133}$+N-концевой метионин) не попадала в эпителиальные клетки, что позволяет предположить, что для эндоцитоза может требоваться функциональный пептидный фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148.

[132] На **фиг. 16B** представлен оценка транспортировки химеры усечение домена I Cholix - гормон роста человека (HGH) через монослои эпителия тощей кишки крысы in vivo через 15 мин после внутрипросветной инъекции, продемонстрированная с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. На **фиг. 16B** показано, что конструкция Cholix-HGH с SEQ ID NO: 212 (содержит $Cholix^{1-150}$+N-концевой метионин) попадала в эпителиальные клетки (в отличие от белка с SEQ ID NO: 211), но оставалась в апикальном и базальном везикулярных пулах и не попадала в собственную пластинку, обеспечивая таким образом доставку внутрь эпителиальной клетки (например, компартмент на базальной стороне эпителиальной клетки).

[133] На **фиг. 16C** представлена оценка транспортировки химеры усечение домена I Cholix - гормон роста человека (HGH) через монослои эпителия тощей кишки крысы in vivo через 15 мин после внутрипросветной инъекции, продемонстрированная с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. На **фиг. 16C** показано, что конструкция Cholix-HGH с SEQ ID NO: 213 (содержит $Cholix^{1-186}$+N-концевой метионин) попадала в эпителиальные клетки, достигала апикального и базального компартментов и, что существенно, также супрануклеарной области клетки, но все-таки оставалась внутри эпителиальной клетки, что позволяет предположить, что функциональный пептидный фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, может обеспечивать доступ и доставку в супрануклеарные области, но не обеспечивает высвобождение конструкции в базолатеральный компартмент (например, в собственную пластинку).

[134] На **фиг. 16D** представлена оценка транспортировки химеры усечение домена I Cholix - гормон роста человека (HGH) через монослои эпителия тощей кишки крысы in vivo через 15 мин после внутрипросветной инъекции, продемонстрированная с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. На **фиг. 16D** показано, что конструкция Cholix-HGH с SEQ ID NO: 218 (содержит $Cholix^{39-186}$+N-концевой метионин) попадала в эпителиальные клетки, но оставалась в апикальном компартменте и, по-видимому, не достигала базального или супрануклеарного компартментов.

[135] На **фиг. 16E** представлена оценка транспортировки химеры усечение домена I Cholix - гормон роста человека (HGH) через монослои эпителия тощей кишки крысы in vivo через 15 мин после внутрипросветной инъекции, продемонстрированная с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. На **фиг. 16E** показано, что конструкция Cholix-HGH с SEQ ID NO: 161 (содержит $Cholix^{1-205}$+N-концевой метионин) завершила процесс трансцитоза, на что указывает доставка химеры в клетки в собственной пластинке, что позволяет предположить, что функциональный пептидный фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152 (например, аминокислотные остатки 187-206 SEQ ID NO: 5), может обеспечивать высвобождение конструкции из эпителия в базолатеральный компартмент (например, в собственную пластинку).

[136] На **фиг. 16F** представлена оценка транспортировки химеры усечение домена I Cholix - гормон роста человека (HGH) через монослои эпителия тощей кишки крысы in vivo через 15 мин после внутрипросветной инъекции, продемонстрированная с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии. На **фиг. 16F** показано, что конструкция Cholix-HGH с SEQ ID NO: 164 (содержит $Cholix^{1-265}$+N-концевой метионин, SEQ ID NO: 5) завершила процесс трансцитоза, на что указывает доставка химеры в клетки в собственной пластинке аналогично конструкции Cholix-HGH с SEQ ID NO: 164.

[137] На **фиг. 17** показано, что выбранные аминокислотные фрагменты домена I Cholix обеспечивают апикально-базальный трансцитоз in vitro и in vivo. Полимерный каркас, содержащий пептидные последовательности аминокислот из позиций 1-39, 134-151, 151-178 и 178-206 домена I Cholix с SEQ ID NO: 5 в различных комбинациях, метили

разными формами квантовых точек (например, сульфидом кадмия, сульфидом свинца и т.д.).

[138] На **фиг. 17A** представлен трансцитоз различных усеченных конструкций Cholix (Chx) через поляризованный эпителий кишечника in vitro через 2 ч. Количество транспортированного материала выражено в виде кратного усиления флуоресценции относительно препарата полимер-квантовая точка с отсутствующими какими-либо Chx пептидами. (N=2; среднее значение ± S.E.).

[139] На **фиг. 17B** представлен трансцитоз in vivo конструкции Cholix$^{39\text{-}186}$-HGH (SEQ ID NO: 218) через 15 мин (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[140] На **фиг. 17C** представлен трансцитоз in vivo конструкции (SEQ ID NO: 5)-(4N)-RFP, меченной квантовыми точками через 15 мин (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[141] На **фиг. 18** представлена аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 221 домена 1 Cholix (содержащего и N-концевой метионин), имеющего спейсер с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 210, присоединенный к его С-концу. Этот спейсер можно использовать для присоединения грузовых фрагментов (например, терапевтических средств) к носителю Cholix для транспортировки через эпителиальные слои (например, эпителий кишечника). Выделенные аминокислотные фрагменты могут обеспечить определенные функции в отношении трансцитоза через эпителиальные слои. Например, фрагмент с аминокислотными остатками позиций 134-151 последовательности SEQ ID NO: 5 может способствовать апикальному входу конструкций Cholix в эпителиальные клетки. Выделенный фрагмент с аминокислотными остатками 151-187 (например, SEQ ID NO: 5) может способствовать ранней эндосомной сортировке. Выделенный фрагмент с аминокислотными остатками 187-206 (например, SEQ ID NO: 5) может способствовать полному трансцитозу конструкции Chx, которая описана в настоящей заявке.

[142] На **фиг. 19** представлены потенциальные сайты гликозилирования аспарагиновых остатков, расположенных в позициях N98, N154, N165 и N224 домена I Cholix, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 221.

[143] На **фиг. 20** представлена общая 3D структура домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) с выделенными функциональными фрагментами.

[144] На **фиг. 20A** представлена общая 3D структура домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) с выделенным функциональным фрагментом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 (остатки 134-151 SEQ ID NO: 5).

[145] На **фиг. 20B** представлена общая 3D структура домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) с выделенным функциональным фрагментом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149 (например, остатки 151-187 SEQ ID NO: 5).

[146] На **фиг. 20C** представлена общая 3D структура домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) с выделенным функциональным фрагментом, имеющим аминокислотную

последовательность SEQ ID NO: 152 (например, остатки 187-206 SEQ ID NO: 5).

[147] На **фиг. 21** представлен анализ пути движения конструкции доставки, полученной из Cholix, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154 (конструкцией доставки является M+Cholix^{386}-GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210)-IL-10 от N- к С-концу).

Также можно использовать конструкцию доставки, содержащую домен Cholix (SEQ ID NO: 5), а в качестве груза гормон роста человека (HGH), чтобы показать аналогичные результаты, которые показаны для конструкции, содержащей M+Cholix^{386}.

[148] На **фиг. 21A** показано, что конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) в значительной степени совместно локализована с антигеном EEA1 в местах клетки, согласующихся с миграцией как в апикальном, так и в базальном доменах энтероцитов, что позволяет предположить наличие полученных из Cholix конструкций доставки в компартментах ранних эндосом (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[149] На **фиг. 21B** показано, что конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) (сверху справа) в значительной степени совместно локализована с Rab7 (сверху слева) преимущественно в апикальном компартменте энтероцитов, но только с ограниченной совместной локализацией в клетках в собственной пластинке, что позволяет предположить наличие полученных из Cholix конструкций доставки в компартментах поздних эндосом (снизу слева представлено изображение в белом свете, а снизу справа представлено объединенное окрашивание DAPI).

[150] На **фиг. 21C** показано, что LAMP1 идентифицирован в больших специфических везикулах, соответствующих зрелым лизосомам, которые лишены конструкций доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) (белая стрелки). Однако M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) также совместно локализована с антигеном LAMP1 в местах клетки, отличающихся от лизосомоподобных структур, соответствующих миграции везикул как в апикальном, так и в базальном доменах энтероцитов, что позволяет предположить наличие полученных из Cholix конструкций доставки в компартментах поздних эндосом.

[151] На **фиг. 21D** показано, что химера M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) также в значительной степени совместно локализована с покрытыми клатрином везикулами, в частности в зонах рядом с ядром и в Rabl 1 преимущественно в базальном компартменте энтероцитов, а также в выбранных клетках в собственной пластинке.

[152] На **фиг. 21E** показано, что конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) совместно локализована с эндоплазматическим ретикулумом, что показывает калнексин в профиле рядом с ядром в энтероцитах и в большей части клеток в собственной пластинке. Конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) в значительной степени совместно локализована с промежуточным компартментом Гольджи эндоплазматического ретикулума (ERGIC) и антигеном LAMN1, по-видимому, для перераспределения в ответ на эндоцитоз и трансцитоз носителя, как показано через 1

(фиг. **21F**), 5 (фиг. **21G**), 10 (фиг. **21H**) и 15 минут после инъекции (фиг. **21I**).

[153] На **фиг. 21F** показано, что конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) в значительной степени совместно локализована с промежуточным компартментом Гольджи эндоплазматического ретикулума (ERGIC) и антигеном LAMN1, по-видимому, для перераспределения в ответ на эндоцитоз и трансцитоз носителя, как показано через 1 минуту после инъекции (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[154] На **фиг. 21G** представлена совместная локализация конструкции доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) с антигеном LAMN1 через 5 минут после инъекции (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[155] На **фиг. 21H** представлена совместная локализация конструкции доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) с антигеном LAMN1 через 10 минут после инъекции.

[156] На **фиг. 21I** представлена совместная локализация конструкции доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) с антигеном LAMN1 через 15 минут после инъекции.

[157] На **фиг. 21J** показано, что конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) не локализована совместно с низкими уровнями гиантина, присутствующего в энтероцитах. Некоторое количество гиантина совместно локализовано с химерой в подгруппе клеток, присутствующих в собственной пластинке, что позволяет предположить, что носитель, полученный из Cholix не локализован в компартменте Гольджи (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[158] На **фиг. 21K** показано, что антиген 58K локализован в энтероцитах в сайте, апикальном к ядру, а конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) демонстрирует некоторую совместную локализацию с этим антигеном таким образом, который предполагает кратковременное перемещение через этот компартмент. Антиген 58K не наблюдался в клетках в собственной пластинке (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[159] На **фиг. 21L** показано, что конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) показала некоторый уровень совместной локализации с антигеном TGN38 (сверху справа), который показал клеточное распределение, ограниченное апикальной стороной ядер в энтероцитах и рядом с ядром в нескольких клетках в собственной пластинке (изображение в белом свете и объединенное изображение показаны снизу слева и снизу справа, соответственно).

[160] На **фиг. 21M** показано, что конструкция доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) (окрашивание показано зеленым сверху справа) в значительной степени совместно локализована с Rabl 1 (сверху слева), преимущественно в базальном компартменте энтероцитов и в выбранных клетках в собственной пластинке (изображение в белом свете и объединенное изображение показаны снизу слева и снизу справа, соответственно).

[161] На **фиг. 22** представлен 1D SDS-PAGE, показывающий, что эффективный протокол с использованием наноразмерных магнитных шариков (диаметром 25 нМ или 100 нМ), снабженных нетоксичными несущими элементами, полученными из Cholix, можно использовать для специфического захвата белка для анализа белков, которые взаимодействуют с Cholix или полученными из него носителями.

[162] На **фиг. 23** показано, что после множества промывок везикулы, обогащенные магнитными шариками, можно растворить в буфере для лизиса, а присутствующие белковые компоненты можно выделить с помощью 2-D SDS-PAGE для анализа.

[163] На **фиг. 24** показано, что профили этих белков можно сравнивать с общим содержанием белка в клетках и что масс-спектрометрию можно использовать для идентификации конкретных элементов, связанных с везикулярными структурами, доступных для полученных из Cholix конструкций доставки.

[164] На **фиг. 25** представлено сравнение результатов повторов, описанного выше протокола, используемого для идентификации набора кандидатов на взаимодействие. Затем взаимодействующие белки можно исследовать на их содержание в клетках Caco-2 и в тонком кишечнике крысы. Взаимодействие Cholix с идентифицированными белками-кандидатами можно подтвердить с использованием покрытых носителем Cholix магнитных шариков и очищенного белка-кандидата.

[165] На **фиг. 26** показано, что инкубация покрытых носителем Cholix (имеющим аминокислоту SEQ ID NO: 154) шариков с чистыми белками и последующие Western Blots или ELISA могут обеспечить обнаружение взаимодействия Cholix-белок. Например, на этой фигуре представлено взаимодействие носителя Cholix с гепарансульфат-протеогликаном (HSPG), Dickkopf-родственным белком 1 (DKK1), регулируемым глюкозой белком 75 шапероном (GRP75) и цитокератином-8 (K8 или CK8).

[166] На **фиг. 27** представлена совместная локализация под микроскопом белков-кандидатов и конструкции доставки, полученной из Cholix, в тощей кишке крысы. Совместная локализация конструкции доставки, содержащей белок-носитель Cholix, соединенный с IL-10 (SEQ ID NO: 154, M+Cholix^{386}-GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210)-IL-10), с CK8 показана in vivo.

[167] На **фиг. 27A** представлена совместная локализация после обработки тощей кишки крысы посредством введения в просвет конструкции доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) через 1 минуту (белая стрелка #1 выделяет апикальную поверхность, а белая стрелка #2 выделяет базальную поверхность).

[168] На **фиг. 27B** представлена совместная локализация после обработки тощей кишки крысы посредством введения в просвет конструкции доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) в течение 5 минут.

[169] На **фиг. 27C** представлена совместная локализация после обработки тощей кишки крысы посредством введения в просвет конструкции доставки M+Cholix^{386}-IL-10 (SEQ ID NO: 154) в течение 10 минут. Таким образом, показано, что совместная локализация в супрануклеарной области повышается с течением времени.

[170] На **фиг. 28** представлено сравнение результатов, полученных в IHC исследовании с атласом человека, чтобы обеспечить, что распределение рецепторов совпадает между исследованиями in vivo на крысах и кишечником человека. В данном случае исследованы два рецептора, идентифицированных с помощью масс-спектрометрии и подтвержденных в тощей кишке крысы.

[171] На **фиг. 28A** показано, что локализация GRP75 в кишечнике совпадает для кишечника крысы и человека.

[172] На **фиг. 28B** показано, что локализация HSPC в кишечнике совпадает для кишечника крысы и человека.

[173] На **фиг. 29** представлено влияние нокаута HSPG посредством CRISPR на функцию транспортировки конструкции доставки (SEQ ID NO: 164), содержащей домен I Cholix (SEQ ID NO: 5), соединенный с HGH (SEQ ID NO: 214), посредством спейсера полиглицин-серин (SEQ ID NO: 210) и HGH только в качестве внутреннего контроля неселективной транспортировки. Клетки посеяли по $1,5\times10^5$ клеток/мл в трансвеллах. На 18 день измеряли трансэпителиальное/трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TEER), и в апикальные камеры добавляли PBS, содержащий 20 мкг/мл конструкции доставки. Через 3 ч собирали и концентрировали базолатеральные образцы. Степень транспортировки белка анализировали с помощью Вестерн блоттинг с использованием антитела против HGH. Результаты, показанные на фиг. 29, демонстрируют, что трансцитоз и активная, селективная транспортировка белков-носителей, полученных из Cholix, зависит от HSPG, так как носитель Cholix показал значительно меньшую функцию трансцитоза в клетках с нокаутом HSPC по сравнению с нормальными клетками Caco-2, положительными по HSPG.

[174] На **фиг. 30** представлено влияние нокаута K8, HSPC и GRP75 на функцию трансцитоза конструкций доставки, полученных из домена I Cholix. Стабильные клеточные линии клеток Caco-2 с отсутствующей экспрессией конкретных белков-кандидатов использовали в качестве монослоев in vitro для проверки их потребности в трансцитозе носителей с использованием активных и селективных эндогенных механизмов транспортировки. Специфическая транспортировка содержащей HGH конструкции доставки по сравнению с неселективной транспортировкой только HGH уменьшалась при нокауте HSPG и GRP75, но не при нокауте K8.

[175] На **фиг. 30A** представлено влияние нокаута K8.

[176] На **фиг. 30B** представлено влияние нокаута HSPC.

[177] На **фиг. 30C** представлено влияние нокаута GRP75.

[178] На **фиг. 30D** представлен контрольный эксперимент.

[179] На **фиг. 31** представлено связывающее взаимодействие Biacore, используемое для изучения зависимости от pH взаимодействия носитель Cholix-GRP75. Белки-носители Cholix соединили с магнитными шариками с использованием биоконъюгации биотин-стрептавидин и инкубировали с очищенным белком GRP75 в буферных растворах с pH 5,5, 6,5 и 7,5, соответственно. Самая высокая аффинность связывания показана при pH 6,5.

[180] На **фиг. 32** представлена иллюстративная модель поверхности домена I Cholix (SEQ ID NO: 5), которую использовали для выделения выбираемых зон, потенциально интересных в этом процессе трансцитоза из-за их проекции с поверхности белка. Интересно отметить, что две области аминокислот между M^{1} и G^{40} находятся рядом с открытыми на поверхности аминокислотами D^{151}-A^{187} и A^{187}-L^{206}. Конкретно, L^{18}-I^{26} (домен X1) и T^{171}-I^{176} (домен X2) скоординированы с образованием кармана, окруженного несколькими отрицательными зарядами. Аналогично, K^{187}-H^{203} (домен X3) скоординирован с I^{32}-E^{40} (домен X4) с образованием непрерывной гребневой структуры.

[181] На **фиг. 32A** представлена близость доменов X3 и X4.

[182] На **фиг. 32B** представлена близость доменов X1 и X2, а также X3 и X4.

[183] На **фиг. 32C** представлена близость доменов X1 и X2.

[184] На **фиг. 32D** представлена близость доменов X1 и X2, а также X3 и X4.

Подробное описание

Введение

[185] Хотя в настоящей заявке были показаны и описаны различные варианты осуществления изобретения, специалистам в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления представлены только в качестве примера. Специалистам в данной области может встретиться множество отличий, изменений и замен без отклонения от изобретения. Следует понимать, что можно использовать различные альтернативы вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящей заявке.

[186] В настоящем раскрытии представлены способы и композиции для транспортировки и/или доставки грузовой молекулы в определенное местоположение (местоположения) внутри клетки (например, супрануклеарное местоположение) или через клетку (например, эпителиальную клетку), либо in vitro, либо in vivo (например, у грызуна или человека). Такой груз можно направить в какое-то место (ряд мест) путем его связывания с молекулой-переносчиком. Такая молекула-переносчик может взаимодействовать с уникальными рецепторами как на клеточной поверхности, так и внутри клетки для нацеленной доставки груза. В настоящей заявке описаны различные такие носитель, грузы и способы их использования.

[187] Если в настоящей заявке не указано иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим раскрытием, должны иметь значения, которые обычно понятны рядовым специалистам в данной области. Кроме того, если в контексте не требуется иное, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. Как правило, описанные в настоящей заявке номенклатура и методы, используемые в связи с культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией, генетикой, химией белков и нуклеиновых кислот и гибридизацией, являются обычно используемыми и хорошо известными в данной области. Способы и технологии согласно настоящему раскрытию обычно выполняются в соответствии с обычными методами, хорошо известными в данной области и, описанными в различных общих и более конкретных

ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании, если не указано иное. См. например, Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2012) и Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992), каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки. Ферментативные реакции и методы очистки выполняют в соответствии с описанием производителя, как это обычно делается в данной области техники или как описано в настоящей заявке. Номенклатура, используемая в связи с лабораторными процедурами и методами аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, описанных в настоящей заявке, является обычно используемой и хорошо известной в данной области. Для химического синтеза, химического анализа, фармацевтического приготовления, составления и доставки, а также лечения пациентов используются стандартные методы.

[188] В рамках настоящего изобретения аминокислотная последовательность может иметь одну или несколько модификаций аминокислотных последовательностей на N-конце. Аминокислотная последовательность, как раскрыто в настоящей заявке, может содержать «N-кэп». Обычно, N-кэп, как раскрыто в настоящей заявке, может относиться к модификации N-конца пептида или полипептида множеством способов, и в частности может относиться к (i) добавлению одной или нескольких аминокислотных последовательностей или других фрагментов (например, средств изменения аффинности, проникающих в клетку пептидных последовательностей и т.д.) и (ii) модификации одного или более аминокислотных остатков в первых 1-10 N-концевых аминокислот пептида или полипептида, причем аминокислотная модификация является относительной к эталонной последовательности или консенсусной последовательности (см. Например, сравнение первой 4 N-концевых аминокислотных остатков полипептидных последовательностей SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, которые описаны в настоящей заявке). N-кэп может содержать дополнительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 15 или 100 дополнительных аминокислотных остатков, которые присоединены к (например, химически соединены с) с N-концом аминокислотной последовательности, такой как полученная из Cholix молекула-переносчик. N-кэп может дополнительно содержать один или более вариантов аминокислотной последовательности на N-конце. Например, носитель, полученный из домена I Cholix, может содержать N-кэп. N-кэп может содержать замену одного или более N-концевых аминокислотных остатков другими аминокислотными остатками. N-кэп может дополнительно содержать N-концевой метиониновый остаток. Одна или несколько этих модификаций могут быть результатом получения аминокислотной последовательности домена I Cholix в бактериальной системе продуцирования (например, E. coli). Например, домен I Cholix может содержать аминокислотные остатки 1-265 SEQ ID NO: 1, которые приведены в SEQ ID NO: 4. Бактериально экспрессируемый домен Cholix может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, которая соответствует SEQ ID NO: 4 плюс N-концевые

метиониновые остатки, которые также могут упоминаться в настоящей заявке как M+Cholix$^{1-265}$ или M+Cholix^{265}.

[189] В рамках настоящего изобретения термин «не имеет домена» или «с отсутствующим доменом» обычно относится к отсутствию полного домена, но необязательно, содержанию его части или фрагмента. Например, носитель, который получен из домена I экзотоксина, но не имеет домена II, домена Ib и домена III указанного экзотоксина, обычно относится к носителю, который не содержит полных аминокислотных последовательностей (например, 100% идентичности последовательностей с) любым из доменов II, Ib и III, но который может необязательно содержать его части или фрагменты. Таким образом, носитель, полученный из домена Cholix и с отсутствующим доменом II Cholix, который описан в настоящей заявке, может содержать домен I Cholix, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 и дополнительно 50-80 аминокислотных остатков домена II Cholix (например, аминокислоты 1-50 или 1-80 SEQ ID NO: 126) и или дополнительно 50-80 аминокислотных остатков домена III Cholix (например, аминокислоты 1-50 или 1-80 SEQ ID NO: 128).

[190] В рамках настоящего изобретения термины «присоединенный к», «соединенный с», «связанный с», «конъюгированный с» и «слитый с» можно использовать взаимозаменяемо, и обычно они означают, что первая молекула (например, полипептид) связана со второй молекулой (например, полипептидом, малой молекулой и т.д.). Связь может быть посредством химической связи, причем химическая связь может быть ковалентной или не ковалентной. Ковалентную химическую связь между первым полипептидом и вторым полипептидом можно получить путем синтетического связывания первого полипептида со вторым полипептидом, или ее можно получить путем рекомбинантного слияния первого полипептида со вторым полипептидом. Таким образом, первая (например, первый полипептид) молекула может быть химически (например, синтетически) или рекомбинантно соединен со второй молекулой (например, вторым полипептидом).

[191] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в настоящей заявке взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков. Кроме того, термины «токсин», «носитель», «конструкция доставки», «химерная конструкция», «белок» и «полипептид» можно использовать взаимозаменяемо, и обычно они относятся к молекуле, которую можно соединить с гетерологичным грузом. Обычно, «конструкции доставки» и «химерные конструкции» представляют собой «пептиды», «полипептиды» или «белки», описанные в настоящей заявке в виде цепей аминокислот, атомы альфа углерода которых связаны пептидными связями. Вследствие этого, концевая аминокислота на одном конце цепи (амино конце) имеет свободную аминогруппу, хотя концевая аминокислота на другом конце цепи (карбокси конце) имеет свободную карбоксильную группу. В рамках настоящего изобретения термин «амино конец» (сокращенно обозначаемый N-конец) относится к свободной α-амино группе на

аминокислоте на амино конце пептида или к α-амино группе (имино группе, когда участвует в пептидной связи) аминокислоты в любом другом месте в пептиде. Аналогично, термин «карбокси конец» относится к свободной карбоксильной группе на карбокси конце пептида или карбоксильной группе аминокислоты в любом другом месте в пептиде. Пептиды также содержат по существу любую полиаминокислоту, включая, но без ограничения, пептидные миметики, такие как аминокислоты, соединенные эфирной связью в отличие от амидной связи. Обычно, пептиды, полипептид и белки, которые описаны в настоящей заявке, могут быть получены рекомбинантно или химически синтезированы (например, с использованием твердофазного синтеза) или с помощью их комбинации.

[192] В рамках настоящего изобретения термин «доставка» обычно относится к наличию молекулы (например, гетерологичного груза) в некотором месте (например, во внутриклеточном компартменте или в супрануклеарной области) в течение определенного периода времени. термин «доставка» может относиться к наличию молекулы (например, гетерологичного груза) в некотором месте (например, во внутриклеточном компартменте или в супрануклеарной области) в течение времени, достаточного для вызова определенного биологического действия, такого как взаимодействие (например, связывание) с белком (например, ферментом или рецептором) в этом месте. Доставка молекулы (например, гетерологичного груза) в место (например, внутриклеточный компартмент или супрануклеарную область) может относиться к удержанию молекулы в этом месте. Удержание молекулы в определенной внутриклеточной или внеклеточной области или компартменте может длиться определенное время, например, по меньшей мере 2 минуты, по меньшей мере 5 минут, по меньшей мере 10 минут, по меньшей мере 15 минут, по меньшей мере 30 минут или по меньшей мере 60 минут. Удержание молекулы может зависеть от различных факторов, таких как место, где удерживается молекула и/или типы молекулярных взаимодействий, которые происходят между молекулой (например, носителем, конструкцией доставки и/или гетерологичным грузом). Например, доставка гетерологичного груза в базолатеральный компартмент посредством трансцитоза через поляризованную эпителиальную клетку может включать удержание гетерологичного груза в базолатеральном месте в течение времени, достаточного для достижения определенного эффекта, например, терапевтического эффекта в случае терапевтического и/или биологически активного груза.

[193] Полипептиды согласно раскрытию включают в себя полипептиды, которые были модифицированы любым способом и по любой причине, например, для: (1) снижения чувствительности к протеолизу (2) снижения чувствительности к окислению (3) изменения аффинности связывания для образования белковых комплексов (4) изменения аффинности связывания и (5) придания или модификации других физико-химических или функциональных свойств. Например, одну или множество аминокислотных замен (например, консервативных аминокислотных замен) можно произвести во встречающейся в природе последовательности (например, в части полипептида за пределами домена

(доменов), образующего межмолекулярные контакты). «консервативная аминокислотная замена» относится к замене в полипептиде аминокислоты на функционально аналогичную аминокислоту. Каждая из следующих шести групп содержит аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг друга:

1) Аланин (A), Серин (S) и Треонин (T)

2) Аспарагиновая кислота (D) и Глутаминовая кислота (E)

3) Аспарагин (N) и Глутамин (Q)

4) Аргинин (R) и Лизин (K)

5) Изолейцин (I), Лейцин (L), Метионин (M) и Валин (V)

6) Фенилаланин (F), Тирозин (Y) и Триптофан (W)

[194] «неконсервативная аминокислотная замена» относится к замене элемента одного из этих классов на элемент из другого класса. При внесении таких изменений согласно различным вариантам осуществления можно учитывать индекс гидропатичности аминокислот. Каждой аминокислоте присваивают индекс гидропатичности на основе ее гидрофобности и характеристик заряда: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5). В других вариантах осуществления носителем конструкций доставки является химерный носитель, содержащий пептид, полипептид, малую молекулу, аптамер, их фрагменты или любые их комбинации.

[195] Важность индекса гидропатичности аминокислоты для придания интерактивной биологической функции белку понятна в данной области (см. Например, Kyte et al. 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131). Известно, что некоторые аминокислоты можно заменять на другие аминокислоты, имеющие аналогичный индекс или балл гидропатичности, сохраняя при этом аналогичную биологическую активность. В разных вариантах осуществления при внесении изменений на основе индекса гидропатичности включают замену аминокислот, индексы гидропатичности которых находятся в пределах+2. В разных вариантах осуществления включают те, что находятся в пределах+1, и в других вариантах осуществления включают те, что находятся в пределах+0,5.

[196] В данной области также понятно, что замену подобных аминокислот можно эффективно произвести на основе гидрофильности, в частности когда биологически функциональный белок или пептид, полученный таким образом, предназначен для применения в иммунологических вариантах применения, которые раскрыты в настоящей заявке. В разных вариантах осуществления наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью соседних с ними аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, то есть с биологическим свойством белка.

[197] Этим аминокислотным остаткам были присвоены следующие значения

гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспартат (+3,0 +/-0,1); глутамат (+3,0 +/-0,1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 +/-0,1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). При внесении изменений, основанных на аналогичных значениях гидрофильности в разных вариантах осуществления включают замену аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах +2, в разных вариантах осуществления включают те, которые находятся в пределах +1, а в других вариантах осуществления включают те, которые находятся в пределах+0,5.

[198] В таблице **1** представлены иллюстративные аминокислотные замены.

ТАБЛИЦА 1 - иллюстративные аминокислотные замены

Исходные Остатки	**Иллюстративные Замены**	**Предпочтительные Замены**
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4-диаминомасляная кислота, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Норлейцин	Leu

[199] Специалист будет способен определить подходящие варианты полипептидов, которые представлены в настоящей заявке, с использованием хорошо известных методов. Специалист в данной области может идентифицировать подходящие зоны молекулы,

которые можно изменить без нарушения активности путем нацеливания на области, которые как полагают, не являются важными для активности. Специалист может идентифицировать среди аналогичных полипептидов остатки и части молекул, которые являются консервативными. Зоны этих материалов, которые могут быть важными для биологической активности или для структуры, можно подвергать консервативным аминокислотным заменам без нарушения биологической активности или без неблагоприятного воздействия на структуру полипептида.

[200] Кроме того, специалист в данной области может просматривать исследования структуры-функции, идентифицирующие остатки в аналогичных полипептидах, которые являются важными для активности или структуры. С учетом такого сравнения специалист может прогнозировать важность аминокислотных остатков в полипептиде, которые соответствуют аминокислотным остаткам, важным для активности или структуры в аналогичных полипептидах. Специалист в данной области может сделать выбор в пользу химически аналогичных аминокислотных замен для таких спрогнозированных важных аминокислотных остатков.

[201] Специалист в данной области также может анализировать трехмерную структуру и аминокислотную последовательность в отношении этой структуры в аналогичных полипептидах. С учетом такой информации специалист в данной области может прогнозировать выравнивание аминокислотных остатков полипептида по отношению к его трехмерной структуре. Специалист в данной области может решить не вносить радикальных изменений в аминокислотные остатки, которые, как предполагается, находятся на поверхности полипептида, поскольку такие остатки могут участвовать в важных взаимодействиях с другими молекулами. Кроме того, специалист в данной области может создать тестовые варианты, содержащие одну аминокислотную замену в каждом нужном аминокислотном остатке. Затем варианты можно скринировать с использованием анализов активности, известных специалистам в данной области. Такие варианты можно использовать для сбора информации о подходящих вариантах. Например, если было обнаружено, что изменение конкретного аминокислотного остатка привело к разрушению, нежелательному снижению или неподходящей активности, можно избежать вариантов с таким изменением аминокислотной последовательности. Другими словами, на основе информации, собранной в результате таких стандартных экспериментов, специалист в данной области может легко определить аминокислоты, где нужно избегать дополнительных замен либо отдельно, либо в комбинации с другими мутациями.

[202] Термин «фрагмент полипептида» и «усеченный полипептид» в рамках настоящего изобретения относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую делецию по сравнению с соответствующим полноразмерным белком. В разных вариантах осуществления фрагменты могут иметь, например, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300,

по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700, по меньшей мере 800, по меньшей мере 900 или по меньшей мере 1000 аминокислот в длину. В разных вариантах осуществления фрагменты также могут иметь, например, не более 1000, не более 900, не более 800, не более 700, не более 600, не более 500, не более 450, не более 400, не более 350, не более 300, не более 250, не более 200, не более 150, не более 100, не более 50, не более 25, не более 10 или не более 5 аминокислот в длину. Фрагмент может дополнительно содержать на одном или обоих концах одну или несколько дополнительных аминокислот, например, последовательность аминокислот из другого существующего в природе белка (например, домена Fc или лейциновой застежки) или искусственную аминокислотную последовательность (например, искусственную спейсерную последовательность).

[203] Термины «вариант полипептида» и «мутант полипептида» в рамках настоящего изобретения относятся к полипептиду, который содержит аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков вставлены, удалены и/или заменены в аминокислотной последовательности относительно другой полипептидной последовательности. Количество аминокислотных остатков, которые нужно вставить, удалить или заменить, может быть, например, по меньшей мере 1, по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 10, по меньшей мере 25, по меньшей мере 50, по меньшей мере 75, по меньшей мере 100, по меньшей мере 125, по меньшей мере 150, по меньшей мере 175, по меньшей мере 200, по меньшей мере 225, по меньшей мере 250, по меньшей мере 275, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450 или по меньшей мере 500 аминокислот в длину. Варианты настоящего раскрытия включают в себя белки слияния.

[204] «Производное» полипептида представляет собой полипептид, который был химически модифицирован, например, путем конъюгации с другим химическим фрагментом, таким как, например, полиэтиленгликоль, альбумин (например, человеческий сывороточный альбумин), фосфорилирования и гликозилирования.

[205] Термин «% идентичность последовательностей» использован в настоящей заявке взаимозаменяемо с термином «% идентичность» и относится к уровню идентичности аминокислотных последовательностей между двумя или более пептидными последовательностями или уровню идентичности последовательностей нуклеотидов между двумя или более нуклеотидными последовательностями при выравнивании с использованием программы выравнивания последовательностей. Например, в рамках настоящего изобретения 80% идентичность означает то же самое, что и 80% идентичность последовательностей, определенная с помощью определенного алгоритма, и означает, что данная последовательность по меньшей мере на 80% идентична другой длине другой последовательности. В разных вариантах осуществления % идентичность выбирают, например, из по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%,

по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% или более идентичности последовательностей с данной последовательностью. В разных вариантах осуществления % идентичность находится в диапазоне, например, от приблизительно 60% до приблизительно 70%, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, от приблизительно 80% до приблизительно 85%, от приблизительно 85% до приблизительно 90%, от приблизительно 90% до приблизительно 95% или от приблизительно 95% до приблизительно 99%.

[206] Термин «% гомология последовательностей» использован в настоящей заявке взаимозаменяемо с термином «% гомология» и относится к уровню гомологии аминокислотных последовательностей между двумя или более пептидными последовательностями или уровню гомологии нуклеотидных последовательностей между двумя или более нуклеотидными последовательностям, при выравнивании с использованием программы выравнивания последовательностей. Например, в рамках настоящего изобретения 80% гомология означает то же самое, что и 80% гомология последовательностей, определенная с помощью определенного алгоритма, и, соответственно, гомология данной последовательности имеет более 80% гомологию последовательностей по длине данной последовательности. В разных вариантах осуществления % гомологию выбирают, например, из по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% или более гомологии последовательностей с данной последовательностью. В разных вариантах осуществления % гомология находится в диапазоне, например, от приблизительно 60% до приблизительно 70%, от приблизительно 70% до приблизительно 80%, от приблизительно 80% до приблизительно 85%, от приблизительно 85% до приблизительно 90%, от приблизительно 90% до приблизительно 95% или от приблизительно 95% до приблизительно 99%.

[207] Иллюстративные компьютерные программы, которые можно использовать для определения идентичности между двумя последовательностями, включают в себя, помимо прочего, набор программ BLAST, например, BLASTN, BLASTX, TBLASTX, BLASTP и TBLASTN, общедоступных в Интернете по адресу сайт NCBI. См. также Altschul et al. 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10 (со специальной ссылкой на опубликованные настройки по умолчанию, то есть параметры w=4, t=17) и Altschul et al. 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Поиск последовательностей обычно выполняют с использованием программы BLASTP при оценке данной аминокислотной последовательности относительно аминокислотных последовательностей в GenBank Protein Sequences и других общедоступных базах данных. Программа BLASTX предпочтительна для поиска последовательностей нуклеиновых кислот, транслированных во всех рамках считывания, против аминокислотных последовательностей в GenBank Protein Sequences и других общедоступных базах данных. Как BLASTP, так и BLASTX запускают с использованием параметров по умолчанию: штраф за открытие гэпа, равный 11,0, и штраф за продолжение

гэпа, равный 1,0, и используют матрицу BLOSUM-62. См. Id.

[208] Помимо расчета процента идентичности последовательностей алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см. Например, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90:5873-5787 (1993)). Одной мерой сходства, обеспечиваемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая обеспечивает указание вероятности того, что совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями может произойти случайно. Например, нуклеиновая кислота считается аналогичной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет, например, самое большее 0,1, самое большее 0,01 или самое большее 0,001.

[209] «Полинуклеотид» относится к полимеру, состоящему из нуклеотидных единиц. Полинуклеотиды включают в себя существующие в природе нуклеиновые кислоты, такие как дезоксирибонуклеиновая кислота («ДНК») и рибонуклеиновая кислота («РНК»), а также аналоги нуклеиновых кислот. Аналоги нуклеиновых кислот включают в себя те, что включают в себя не существующие в природе основания, нуклеотиды, которые участвуют в связях с другими нуклеотидами, отличающимися от существующей в природе фосфодиэфирной связи, или которые включают в себя основания, присоединенные через связи, отличающиеся от фосфодиэфирных связей. Таким образом, аналоги нуклеотидов включают в себя, например, и без ограничения, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты, фосфоротриэфиры, фосфорамидаты, боранофосфаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидо-нуклеиновые кислоты (РНК) и тому подобное. Такие полинуклеотиды можно синтезировать, например, с использованием автоматического синтезатора ДНК. термин «нуклеиновая кислота» обычно относится к большим полинуклеотидам. термин «олигонуклеотид» обычно относится к коротким полинуклеотидам, обычно не более приблизительно 50 нуклеотидов. Понятно, что, когда нуклеотидная последовательность представлена последовательностью ДНК (то есть A, T, G, C), она также включает последовательность РНК (то есть A, U, G, C), в которой «U» заменяет «T».

[210] Для описания полинуклеотидных последовательностей в настоящей заявке используются обычные обозначения: левый конец одноцепочечной полинуклеотидной последовательности является 5'-концом; левое направление двухцепочечной полинуклеотидной последовательности называется 5'-направление. Направление 5'-3' добавления нуклеотидов к растущим транскриптам РНК называется направление транскрипции. Цепь ДНК, имеющая такую же последовательность, что и мРНК, называется «кодирующей цепью»; последовательности в цепи ДНК, имеющие такую же последовательность, что и мРНК, транскрибированная из этой ДНК и которые расположены от 5' к 5'-конце транскрипта РНК, называются «предшествующие последовательности»; последовательности в цепи ДНК, имеющие такую же

последовательность, что и РНК и которые расположены от 3' к 3'-концу транскрипта кодирующей РНК, называются «последующие последовательности».

[211] «Комплементарный» относится к топологической совместимости или совпадению взаимодействующих поверхностей двух полинуклеотидов. Таким образом, две молекулы можно описать как комплементарные, и кроме того, характеристики контактной поверхности комплементарны друг другу. Первый полинуклеотид комплементарен второму полинуклеотиду, если нуклеотидная последовательность первого полинуклеотида по существу идентична нуклеотидной последовательности партнера по связыванию полинуклеотида второго полинуклеотида или если первый полинуклеотид можно гибридизировать со вторым полинуклеотидом в жестких условиях гибридизации.

[212] «Специфическая гибридизация с» или «специфическая гибридизация» или «селективная гибридизация с» относится к связыванию, дуплексированию или гибридизации молекулы нуклеиновой кислоты предпочтительно с конкретной нуклеотидной последовательностью в жестких условиях, когда эта последовательность находится в сложной смеси (например, общей клеточной) ДНК или РНК. термин «жесткие условия» относится к условиям, в которых зонд будет гибридизироваться предпочтительно со своей подпоследовательностью-мишенью, а с другими последовательностями в меньшей степени или совсем не будет. «Жесткая гибридизация» и «жесткие условия отмывки для гибридизации» в контексте экспериментов с гибридизацией нуклеиновых кислот, таких как Southern и northern гибридизация являются зависимыми от последовательности и различаются при разных параметрах окружающей среды. Подробное руководство по гибридизации нуклеиновых кислот можно найти в Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biохимия and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I, chapter 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, N.Y.; Sambrook et al. 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 3.sup.rd ed. NY; и Ausubel et al. eds. Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.

[213] Обычно очень жесткие условия гибридизации и отмывки выбирают так, чтобы они были приблизительно на 5°C ниже, чем температура плавления (Tm) для конкретной последовательности при определенной ионной силе и pH. Tm - это температура (при определенной ионной силе и pH), при которой 50% последовательности-мишени гибридизуются с идеально подобранным зондом. Выбирают очень жесткие условия, равные Tm для конкретного зонда. Примером жестких условий гибридизации для гибридизации комплементарных нуклеиновых кислот, которые имеют более примерно 100 комплементарных остатков на фильтре в Саузерн или Нозерн блоттинге, является 50% формалин с 1 мг гепарина при 42°C, с гибридизацией, проводимой в течение ночи. Примером очень жестких условий промывки является 0,15 M NaCl при 72°C в течение примерно 15 минут. Примером жестких условий промывки является промывка 0,2

x SSC при 65°C в течение 15 минут. Для описания буфера SSC см. Sambrook et al. Очень жесткой промывке может предшествовать промывка низкой жесткости для удаления фонового сигнала зонда. Иллюстративная промывка средней жесткости для дуплекса, например, из более чем приблизительно 100 нуклеотидов, представляет собой 1 x SSC при 45°C в течение 15 минут. Иллюстративная промывка низкой строгости для дуплекса, например, из более чем приблизительно 100 нуклеотидов, представляет собой 4-6 x SSC при 40°C в течение 15 минут. Как правило, отношение сигнал/шум в 2 раза (или выше), чем наблюдаемое для неродственного зонда в конкретном анализе гибридизации, указывает на обнаружение конкретной гибридизации.

[214] «Праймер» относится к полинуклеотиду, который способен к специфической гибридизации с обозначенной полинуклеотидной матрицей и обеспечивает точку инициации для синтеза комплементарного полинуклеотида. Такой синтез происходит, когда полинуклеотидный праймер помещают в условия, в которых индуцируется синтез, то есть в присутствии нуклеотидов, комплементарной полинуклеотидной матрицы и средства полимеризации, такого как ДНК-полимераза. Праймер обычно бывает одноцепочечным, но может быть двухцепочечным. Праймерами обычно являются дезоксирибонуклеиновые кислоты, но для многих вариантов применения можно использовать большое множество синтетических и существующих в природе праймеров. Чтобы выступать в качестве сайта инициации синтеза, праймер комплементарен матрице, для гибридизации с которой он предназначен, но нет необходимости, чтобы он отражал точную последовательность матрицы. В таком случае специфическая гибридизация праймера с матрицей зависит от жесткости условий гибридизации. Праймеры можно метить, например, хромогенными, радиоактивными или флуоресцентными фрагментами и использовать в качестве обнаруживаемых фрагментов.

[215] «Зонд» при использовании в отношении полинуклеотида относится к полинуклеотиду, который способен к специфической гибридизации с обозначенной последовательностью другого полинуклеотида. Зонд специфически гибридизируется с комплементарным полинуклеотидом-мишенью, но нет необходимости, чтобы он отражал точную комплементарную последовательность матрицы. В таком случае специфическая гибридизация зонда с мишенью зависит от жесткости условий гибридизации. Зонды можно метить, например, хромогенными, радиоактивными или флуоресцентными фрагментами и использовать в качестве обнаруживаемых фрагментов. В случаях, когда зонд обеспечивает точку инициации для синтеза комплементарного полинуклеотида, зонд также может быть праймером.

[216] «Вектор» представляет собой полинуклеотид, который можно использовать для введения в клетку других связанных с ним нуклеиновых кислот. Одним типом вектора является «плазмида», которая относится к линейной или кольцевой двухцепочечной молекуле ДНК, в которую можно лигировать дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другим типом вектора является вирусный вектор (например, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы с дефектной репликацией), причем в

вирусный геном можно ввести дополнительные сегменты ДНК. Некоторые векторы способны автономно реплицироваться в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) встраиваются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяин и, таким образом, реплицируются наряду с геномом хозяина. «вектор экспрессии» представляет собой тип вектора, который может направлять экспрессию выбранного полинуклеотида.

[217] «Регуляторная последовательность» представляет собой нуклеиновую кислоту, которая влияет на экспрессию (например, уровень, время или место экспрессии) нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Регуляторная последовательность может, например, оказывать свое действие непосредственно на регулируемую нуклеиновую кислоту или посредством действия одной или нескольких других молекул (например, полипептидов, которые связываются с регуляторной последовательностью и/или нуклеиновой кислотой). Примеры регуляторных последовательностей включают в себя промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Дополнительные примеры регуляторных последовательностей описаны, например, в Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. and Baron et al. 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06. Нуклеотидная последовательность «функционально связана» с регуляторной последовательностью, если регуляторная последовательность влияет на экспрессию (например, уровень, время или место экспрессии) нуклеотидной последовательности.

[218] Обычно, клеткой согласно настоящему раскрытию может быть эукариотическая клетка или прокариотическая клетка. Клеткой может быть эпителиальная клетка. Эпителиальная клетка может быть поляризованной эпителиальной клеткой (например, клеткой Caco-2 или клеткой яичника китайского хомячка (CHO)). Клеткой может быть клетка животного или клетка растения. Клетка животного может включать клетку морского беспозвоночного, рыбы, насекомых, земноводных, рептилий или млекопитающих. Клетка млекопитающего может быть получена от приматов, обезьян, лошадей, крупного рогатого скота, свиней, собак, кошек или грызунов. Млекопитающее может быть приматом, обезьяной, собакой, кошкой, кроликом, хорьком и тому подобное. Грызун может быть мышью, крысой, хомяком, песчанкой, хомяком, шиншиллой или морской свинкой. Клетка птиц может быть от канарейки, длиннохвостого попугая или попугаев. Клетка рептилии может быть от черепахи, ящерицы или змеи. Клетка рыбы может быть от тропической рыбы. Например, клетка рыбы может происходить от рыбок данио (например, Danino rerio). Клетка червя может быть получена от нематоды (например, C. elegans). Клетка амфибии может быть от лягушки. Клетка членистоногих может происходить от тарантула или краба-отшельника.

[219] Клетка млекопитающего также может включать в себя клетки, полученные от

примата (например, примата человека или не являющегося человеком примата). Клеткой млекопитающего может быть клетка крови, стволовая клетка, эпителиальная клетка, клетка соединительной ткани, секретирующая гормон клетка, нервная клетка, клетка скелетных мышц или клетка иммунной системы. В предпочтительных вариантах осуществления способы и композиции согласно настоящему раскрытию используют в комбинации с одной или несколькими клетками крови млекопитающих.

[220] «клетка-хозяин» представляет собой клетку, которую можно использовать для экспрессии полинуклеотида согласно раскрытию. Клеткой-хозяином может быть прокариот, например, E. Coli, или может быть эукариот, например, одноклеточный эукариот (например, дрожжи или другие грибы), клетка растения (например, клетка растения табака или томата), клетка животного (например, клетка человека, клетка обезьяны, клетка хомячка, клетка крысы, клетка мыши или клетка насекомого) или гибридома. Обычно клетка-хозяин представляет собой культивируемую клетку, которую можно трансформировать или трансфицировать серией нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, которые затем можно экспрессировать в клетке-хозяине. Фразу «рекомбинантная клетка-хозяин» можно использовать для обозначения клетки-хозяина, которая была трансформирована или трансфицирована серией нуклеиновых кислот, кодирующих полипептид, которые должны быть экспрессированы. Клетка-хозяин также может быть клеткой, которая содержит ряд нуклеиновых кислот, но не экспрессирует их на желаемом уровне, если в клетку-хозяин не введена регуляторная последовательность, так чтобы она стала функционально связанной с нуклеиновой кислотой. Понятно, что термин «клетка-хозяин» относится не только к конкретной рассматриваемой клетке, но и к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за, например, мутации или влияния окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но по-прежнему входит в объем используемого в рамках настоящего изобретения термина.

[221] Термин «выделенное молекула» (причем молекулой является, например, полипептид, такой как носитель или конструкция доставки, или полинуклеотид) представляет собой молекулу, которая благодаря своему происхождению или источнику получения (1) не связана со связанными в естественных условиях компонентами, которые сопровождают ее в нативном состоянии (2) по существу не содержит других молекул того же вида (3) экспрессируется клеткой другого вида или (4) не встречается в природе. Таким образом, молекула, которая химически синтезирована или экспрессирована в клеточной системе, отличной от клетки, из которой она происходит в естественных условиях, будет «выделена» из ее связанных в естественных условиях компонентов. Молекула также может по существу не содержать связанных в естественных условиях компонентов за счет выделения с использованием методов очистки, хорошо известных в данной области. Чистоту или гомогенность молекулы можно анализировать с помощью ряда средств, хорошо известных в данной области. Например, чистоту образца полипептида можно

анализировать с использованием электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания геля для визуализации полипептида с использованием методов, хорошо известных в данной области. Для некоторых целей можно обеспечить методы разделения с более высоким разрешением за счет использования HPLC или других средств очистки, хорошо известных в данной области.

[222] В рамках настоящего изобретения термины «полный трансцитоз», «эффективный трансцитоз» или «трансцитоз» или «транспортировка» можно использовать взаимозаменяемо, и они могут относится к транспортировке полученных из токсинов конструкций доставки через эпителиальные слои, такие как эпителий кишечника. Эти термины могут относится к полной транспортировке этих конструкций, что определяют в соответствующем эксперименте с использованием различных методов для оценки эффективности трансцитоза, таких как флуоресцентная микроскопия.

[223] В рамках настоящего изобретения термины «содержащий» и «имеющий» можно использовать взаимозаменяемо. Например, термины «полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1» и «полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1» можно использовать взаимозаменяемо.

[224] Белок или полипептид является «по существу чистым», «по существу гомогенным» или «по существу очищенным», когда по меньшей мере приблизительно 60%-75% образца демонстрирует полипептид одного вида. Полипептид или белок может быть мономерным или мультимерным. По существу чистый полипептид или белок обычно содержит приблизительно 50%, 60%, 70%, 80% или 90% м/м образца белка, чаще приблизительно 95% и, например, будет иметь чистоту более 99%. Чистоту или гомогенность белка можно указывать с помощью ряда средств, хорошо известных в данной области, таких как хорошо известный в данной области электрофорез образца белка в полиакриламидном геле с последующей визуализацией единственной полипептидной полосы при окрашивании геля красителем. Для некоторых целей можно обеспечить методы разделения с более высоким разрешением за счет использования HPLC или других средств очистки, хорошо известных в данной области.

[225] В рамках настоящего изобретения «спейсер» относится к молекуле, которая соединяет две другие молекулы, либо ковалентно, либо посредством ионных, ван-дер-вальсовых или водородных связей, например, молекула нуклеиновой кислоты, которая гибридизируется с одной комплементарной последовательностью на 5’-конце и с другой комплементарной последовательностью на 3’-конце, соединяя таким образом две не комплементарные последовательности. «Расщепляемый спейсер» относится к спейсеру, который можно разрушить или иным образом разрезать для разделения двух компонентов, соединенных расщепляемым спейсером. Расщепляемые спейсеры обычно расщепляются ферментами, обычно пептидазами, протеазами, нуклеазами, липазами и тому подобное. Расщепляемые спейсеры также могут расщепляться под воздействием факторов окружающей среды, таких как, например, специфическая ферментативная

активность, изменения температуры, pH, концентрации соли и т. Д. Когда такое изменение среды происходит после трансцитоза конструкций доставки через поляризованную эпителиальную мембрану. Таким образом, гетерологичный груз (например, биологически активный груз) может высвобождаться из носителя pH-зависимым и/или зависимым от фермента образом.

[226] «Фармацевтическая композиция» относится к композиции, подходящей для фармацевтического применения у животного. Фармацевтическая композиция содержит фармакологически эффективное количество активного средства и фармацевтически приемлемый носитель. «Фармакологически эффективное количество» относится к такому количеству средства, которое эффективно для получения нужного фармакологического результата.

[227] «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, средств доставки, буферов и вспомогательных веществ, таких как солевой раствор с фосфатным буфером, 5% водной раствор декстрозы и эмульсии, такие как эмульсия масло/вода или вода/масло, и смачивающие средства и/или адъюванты различных типов. Подходящие фармацевтические носители и составы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 21st Ed. 2005, Mack Publishing Co, Easton. «Фармацевтически приемлемой солью» является соль, которую можно включить в соединение для фармацевтического применения, включая, например, соли металлов (натрия, калия, магния, кальция и т.д.) и соли аммиака или органических аминов.

[228] Термины «лечить», «лечение» и «обработка» относится к способу облегчения или устранения биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из сопутствующих ему симптомов. В рамках настоящего изобретения «облегчение» заболевания, расстройства или состояния означает уменьшение тяжести и/или частоты появления симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, ссылки в настоящей заявке на «лечение» включают в себя ссылки на радикальное, паллиативное и профилактическое лечение.

[229] В рамках настоящего изобретения термин «субъект», обычно относится к человеку или другому животному. Субъект может быть любого возраста, например, субъектом может быть младенец, малыш, ребенок, человек предподросткового, подросткового, взрослого или пожилого возраста.

[230] Диапазоны в настоящей заявке могут быть выражены в виде от «приблизительно» одного конкретного значения и/или до «приблизительно» другого конкретного значения. При выражении такого диапазона другой вариант осуществления включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогично, когда значения выражены в виде приближений, с использованием перед ними «приблизительно», должно быть понятно, что конкретное значение образует другой вариант осуществления. Также будет понятно, что конечные точки каждого из диапазонов связаны с другой конечной точкой и не зависят от другой конечной точки. термин «приблизительно» в рамках настоящего изобретения относится к диапазону, который

составляет плюс или минус 15% от заявленного числового значения в контексте конкретного использования. Например, приблизительно 10 может включать диапазон от 8,5 до 11,5.

Носители

[231] В настоящей заявке представлены различные носители, которые можно использовать для доставки груза в место внутри клетки (например, эпителиальной клетки) или через клетку (например, эпителиальную клетку). Такие носители могут представлять собой малую молекулу, полипептид, аптамер, антитело, нуклеиновую кислоту, фрагмент любого из перечисленного выше или комбинацию любых из перечисленных выше.

[232] Примеры полипептида, представленного в настоящей заявке, включают в себя любой полипептид, который получен из домена I экзотоксина и с отсутствующим доменом II, доменом Ib и доменом III экзотоксина. Такие домены I включают в себя, но без ограничения, аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 137. Полипептиды, которые получают из любых из приведенных выше последовательностей, включают в себя те, что имеют высокую гомологию последовательностей с приведенными выше последовательностями (например, более 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность последовательностей, как определено более подробно в настоящей заявке). Полипептиды, которые получают из любых из приведенных выше последовательностей, включают в себя те, которые представляют собой фрагменты приведенных выше, которые функционируют для доставки груза в определенное место внутри клетки или через клетку (например, эпителиальную клетку).

[233] Примеры малых молекул, представленных в настоящей заявке, включают в себя те, которые рационально сконструированы для взаимодействия с одним или более из следующих рецепторов рибофилином 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и/или перлеканом и/или имеют аналогичную или такую же 3D структуру домена I экзотоксина (например, Cholix или PE) или функциональный фрагмент домена I экзотоксина.

[234] Примеры антител или их функциональных связывающих фрагментов, которые представлены в настоящей заявке, включают в себя те, которые рационально сконструированы для взаимодействия с одним или более из следующих рецепторов рибофилином 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и/или перлеканом и/или имеют аналогичную или такую же 3D структуру домена I экзотоксина (например, Cholix или PE) или функциональный фрагмент домена I экзотоксина.

[235] Примеры нуклеиновых кислот, которые представлены в настоящей заявке, включают в себя те, которые рационально сконструированы для взаимодействия с одним или более из следующих рецепторов рибофилином 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и/или перлеканом и/или имеют аналогичную или такую же 3D структуру домена I экзотоксина (например, Cholix или PE) или функциональный фрагмент домена I экзотоксина. Нуклеиновой кислотой может быть мРНК, миРНК, кшРНК или кДНК.

[236] Способы и композиции согласно настоящему раскрытию основаны на неожиданном открытии авторов изобретения, что носитель, способный взаимодействовать

с одним или более эндогенными рецепторами (например, рибофилином 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и/или перлеканом), может обеспечивать быструю и эффективную доставку груза в клетку, такую как эпителиальная клетка, и/или через нее.

[237] Способы и композиции, описанные в настоящей заявке, обеспечивают быструю и эффективную транспортировку и/или доставку грузовых молекул через эпителиальные клетки и/или во внутреннюю часть (например, во внутриклеточную везикулу или компартмент или цитозоль) эпителиальных клеток (например, поляризованных эпителиальных клеток кишечника). В настоящем раскрытии представлены конструкции (например, выделенная конструкции доставки), которые могут содержать носитель, соединенный с гетерологичным грузом. Носитель, который раскрыт в настоящей заявке, может менять молекулярный размер и состав, а также другие физико-химические параметры, такие как изоэлектрическая точка, общий молекулярный чистый заряд и т.д. Обычно и как описано дальше в настоящей заявке, носителем может быть малая молекула, полипептид, аптамер, нуклеиновая кислота, фрагмент и/или любые их комбинации.

[238] Носитель можно получить из экзотоксина, например, любого экзотоксина, описанного в настоящей заявке. Например, носитель может представлять собой не существующую в природе форму экзотоксина Cholix (Cholix) или экзотоксина A Pseudomonas (PE), содержащую только домен I (то есть с отсутствующим доменом II (иногда называемым транслокационным доменом), домен Ib и домен III (иногда называемый цитотоксический домен)), и может быть способен транспортировать и/или доставлять груз (например, гетерологичный груз, такой как биологическая, терапевтическая или диагностическая молекулы) через интактные эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника) и барьеры эпителиальных клеток (например, монослои клеток Caco-2 или эпителий кишечника субъекта) посредством трансцитоза и/или во внутреннюю часть эпителиальной клетки (например, посредством апикального эндоцитоза и последующей эндосомной сортировки и движения).

[239] В настоящем раскрытии представлены способы и композиции, содержащие носитель, причем носитель может быть соединен с грузом и в связи с этим может доставлять груз в эпителиальные клетки или через них. Носителем может быть полипептид, причем полипептид можно получить из экзотоксина. Экзотоксином может быть Cholix или PE или любая их комбинация (например, носитель, содержащий один или более доменов Cholix и PE или их усеченные варианты). Таким образом, носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать элементы или части, полученные как из Cholix, так и из PE, которые могут называться химерным носителем. Как описано дальше в настоящей заявке, неожиданно было обнаружено, что домена I Cholix или домена I PE (например, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 137) или их комбинации может быть достаточно для быстрой и эффективной транспортировки и доставки груза через эпителиальную клетку. Такие транспортировка и доставка могут даже превосходить

функцию трансцитоза соответствующих полноразмерных экзотоксинов Cholix или PE (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 135, соответственно). Полученные из экзотоксинов полипептиды-носители, описанные в настоящей заявке, могут использовать эндогенные пути миграции, включая эндогенные рецепторы и комплексы рецепторов, для достижения апикально-базального трансцитоза и/или поглощения во внутреннюю часть клетки, такой как эпителиальная клетка (например, энтероциты). Носители для доставки согласно настоящему раскрытию могут иметь доступ в базолатеральный компартмент (например, собственную пластинку) и/или внутрь эпителиальной клетки без повреждения клетки или слоя клеток и без изменения, разрушения или модификации (например, химического или ферментативного изменения или модификации). Конструкции носителя (например, выделенные конструкции доставки) согласно настоящему раскрытию могут дополнительно использовать специфические внутриклеточные компартменты во время трансцитоза и/или внутриклеточной доставки для достижения описанной эффективности транспортировки.

[240] В настоящем раскрытии представлены способы и композиции, которые могут содержать носители, которые используют (или взаимодействуют с) набор эндогенных белков и рецепторов, участвующих в апикально-базальном процессе трансцитоза через эпителиальные клетки, такие как поляризованные эпителиальные клетки кишечника (например, энтероциты), чтобы опосредовать трансцитоз носителя, соединенного с грузом, из просвета, граничащего с апикальной поверхностью слизистой мембраны, к базолатеральной стороне слизистой мембраны. Конструкции доставки, раскрытые в настоящей заявке, могут вступать во взаимодействие с такими белками и рецепторами, чтобы обеспечить эффективную транспортировку и доставку различных грузовых молекул в места внутри эпителиальной клетки и/или через эпителиальную клетку к базальной стороне эпителия (например, эпителия кишечника субъекта). Конструкции, описанные в настоящей заявке, такие как конструкции доставки, могут содержать носитель, соединенный с гетерологичным грузом, причем носитель и/или гетерологичный груз могут взаимодействовать с белками и/или рецепторами во время внутриклеточной доставки (например, в супрануклеарную область или в компартмент, расположенный на базальной стороне внутри эпителиальной клетки) или во время трансцитоза (например, везикулярного трансцитоза). Носитель может взаимодействовать с одним или более белками (например, рецепторами или ферментами). Эти взаимодействия могут быть динамичными и/или зависимыми от pH. Следует отметить, что в настоящей заявке описанные взаимодействия являются только примерами и не ограничивают способы и композиции этого раскрытия другими взаимодействиями (например, с другими белками или рецепторам).

[241] Композиции и способы, раскрытые в настоящей заявке, обеспечивают эффективную доставку и транспортировку различных грузовых молекул (например, малых молекул, а также макромолекул) через эпителиальные клетки и/или в эпителиальные клетки. Носители, описанные в настоящей заявке, обеспечивают такую

эффективную доставку груза таким образом, чтобы не повреждать ни барьер эпителиальных клеток, ни саму конструкцию доставки. Таким образом, функциональные свойства конструкций доставки (например, свойства носителя, а также функции груза) можно сохранять во время транспортировки, обеспечивая быструю и эффективную доставку такого груза. Описанные в настоящем документе носители используют эндогенные пути миграции для доставки экзогенных или эндогенных грузовых молекул в конкретные места. Такие места могут быть внутри эпителиальной клетки и/или в базолатеральных компартментах за пределами эпителиальных клеток на базальной стороне, например, в собственной пластинке.

[242] Носители согласно настоящему раскрытию можно получить из экзотоксина. Бактериальные белковые токсины хорошо известны в данной области и обсуждаются в таких источниках как Burns, D. et al. eds. BACTERIAL PROTEIN TOXINS, ASM Press, Herndon Va. (2003), Aktories, K. and Just, I. eds. BACTERIAL PROTEIN TOXINS (HANDBOOK OF EXPERIMENTAL PHARMACOLOGY), Springer-Verlag, Berlin, Germany (2000), и Alouf, J. and Popoff, M. eds. THE COMPREHENSIVE SOURCEBOOK OF BACTERIAL PROTEIN TOXINS, Academic Press, Inc. San Diego, Calif (3rd Ed. 2006).

[243] Как описано дальше в настоящей заявке, экзотоксин может содержать один или более доменов. Как раскрыто в настоящей заявке, экзотоксином может быть Cholix или PE. Для Cholix в настоящей заявке использована следующая номенклатура для описания его разных доменов (от N- к C-концу) и использования функционального варианта Cholix, имеющего в качестве эталонной последовательности аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1: (i) домен I (аминокислотные остатки 1-265, SEQ ID NO: 4) (ii) домен II (аминокислотные остатки 266-386, SEQ ID NO: 126) (iii) домен Ib (аминокислотные остатки 387-425, SEQ ID NO: 127) и (iv) домен III (аминокислотные остатки 426-634, SEQ ID NO: 128). Для PE в настоящей заявке использован следующая номенклатура для описания его разных доменов (от N- к C-концу) и использования функционального варианта PE, имеющего в качестве эталонной последовательности аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 135: (i) домен I (аминокислотные остатки 1-252, SEQ ID NO: 137) (ii) домен II (аминокислотные остатки 253-364, SEQ ID NO: 138) (iii) домен Ib (аминокислотные остатки 365-404, SEQ ID NO: 139) и (iv) домен III (аминокислотные остатки 405-613, SEQ ID NO: 140). Кроме того, диапазоны аминокислотных остатков, образующих эти домены, могут быть гибкими, и варианты приблизительно 5-10 аминокислотных остатков также могут попадать в объем этого раскрытия, например, описание аминокислотной последовательности, содержащей аминокислотные остатки 5-265 или 5-270 или 1-260 или 5-260 полноразмерного Cholix все-таки можно понимать как домен I Cholix и так далее. Как раскрыто в настоящей заявке, термины «домен I» и «рецепторсвязывающий домен» экзотоксина можно использовать взаимозаменяемо. Как раскрыто в настоящей заявке, термины «домен II» и «транслокационный домен» экзотоксина можно использовать взаимозаменяемо. Как раскрыто в настоящей заявке, термины «домен III», «каталитический домен» и

«цитотоксический домен» экзотоксина можно использовать взаимозаменяемо.

[244] Экзотоксин Pseudomonas aeruginosa (PE), носитель Corynebacterium diphtheria Diphtheria (DT) и Cholix Vibrio cholera составляют семейство бактериальных белковых токсинов, которые выступают в качестве ADP-рибозилтрансферазы. Таким образом, носитель можно получить из токсина Cholix. Носитель можно получить из PE.

[245] Полипептид Cholix, который описан в настоящей заявке, можно сделать нетоксичным с помощью одной или нескольких аминокислотных замен. Полипептид или носитель, полученный из Cholix, который описан в настоящей заявке, можно сделать нетоксичным с помощью замены остатка глутаминовой кислоты в позиции 581 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 на аланин, с получением в результате конструкции Cholix, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

[246] Как описано дальше в настоящей заявке, Cholix и PE организованы в отдельные домены (I, II, Ib и III), которые обозначены на основе их структурного взаимного расположения. Домен I, по-видимому, облегчает интернализацию и трансцитоз экзотоксина, тогда как домены II, Ib и III обеспечивают другие функции, например, ферментативную активность в случае домена III, который может ADP-рибозилировать фактор элонгации 2 для индукции клеточного апоптоза посредством блокирования синтеза белка. Раньше было неизвестно, какие компоненты белков PE и Cholix участвуют в процессе трансэпителиального трансцитоза.

[247] Cholix секретируется Vibrio cholera в виде белка массой 70,7 кДа, состоящего из трех заметных глобулярных доменов (Ia, II, и III) и одного малого субдомена (Ib), соединяющего домены II и III, аналогично структуре PE (Jorgensen, R. et al. J Biol Chem 283(16):10671-10678, 2008). Зрелый Cholix включает в себя род функциональных вариантов, причем каждый вариант может отличаться одним или более аминокислотными остатками по сравнению с другим вариантом. Однако все варианты Cholix, раскрытые в настоящей заявке, и охваченные этим раскрытием, являются функциональными вариантами Cholix. В рамках настоящего изобретения Cholix представляет собой белок с 634 остатками, и в настоящее описание конкретно включены два функциональных варианта, которые имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 1. В рамках настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая зрелый Cholix, представлена в SEQ ID NO: 134.

[248] Экзотоксин A Pseudomonas или «PE» секретируется Pseudomonas aeruginosa в виде белка массой 67 кДа, состоящего из трех заметных глобулярных доменов (Ia, II, и III) и одного малого субдомена (Ib), соединяющего домены II и III (см. Allured et. al. Proc. Natl. Acad. Sci. 83:1320 1324, 1986). В рамках настоящего изобретения зрелый PE представляет собой белок с 613 остатками, последовательность которых представлена в SEQ ID NO: 134. В рамках настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая зрелый PE, представлена в SEQ ID NO: 135.

[249] Аминокислотная последовательность зрелого токсина Cholix приведена в SEQ ID NO: 1 и использована в качестве эталонной последовательности, если не указано

иное. Например, аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 4 содержит аминокислотные остатки 1-265 аминокислотной последовательности зрелого токсина Cholix SEQ ID NO: 1 и определена как домен I Cholix. Таким образом, полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, также может быть описан как «Chx^{1-265}» (или «$Cholix^{1-265}$» или «$Cholix^{265}$» или «домен I Cholix»). Помимо эталонной последовательности Cholix, приведенной в SEQ ID NO: 1, в настоящем раскрытии охвачены любые другие функционально активные варианты экзотоксина Cholix, например, те, что содержат консенсусную последовательность, определяющую функциональную активность экзотоксинов Cholix. (См. например, Awasthi et al. Novel Cholix toxin variants, ADP-ribosylating toxins in Vibrio Cholerae Non-O1/Non-O139 strains, and their pathogenicity, Инфекцию and Immunity, 81(2), p. 531-541 (2013)). Например, полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, представляет собой функциональный вариант SEQ ID NO: 1. В связи с этим можно использовать домен I, полученный из этой последовательности экзотоксина Cholix, или его усеченный вариант в качестве носителя для быстрой и эффективной доставки груза. Используя номенклатуру, описанную в настоящей заявке, с эталонной последовательностью SEQ ID NO: 1, полипептид домена I экзотоксина Cholix с SEQ ID NO: 2 также может быть описан как аминокислотные остатки 1-4 SEQ ID NO: 2+$Cholix^{5-265}$.

[250] В других случаях и как описано в настоящей заявке, первый носитель и второй носитель получают в разных системах экспрессии (например, системах экспрессии бактерий или млекопитающих). Бактериальные системы экспрессии включают в себя E. coli, а системы экспрессии млекопитающих включают в себя, например, клетки CHO. Получаемый бактериально полипептид может содержать N-кэп, причем N-кэп может содержать еще одну модификацию на N-конце полипептида. N-кэп может содержать N-концевой метиониновый остаток. Примеры полипептидов-носителей, полученных из домена I Cholix, которые можно получать бактериально и которые содержат такой N-концевой метионин, включают в себя те, что содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107 и SEQ ID NO: 125.

[251] В настоящем раскрытии представлены носители, полученные из выделенных не существующих в природе и бактериальных токсинов (например, полученные из экзотоксина), которые можно соединить с грузом (например, биологически активные); причем носитель способен доставлять груз (например, биологически активный) посредством трансцитозной транспортировки через эпителий кишечника. Носитель можно получить из домена I экзотоксина (например, Cholix или PE). В носителе, который получен из домена I экзотоксина, может отсутствовать домен II (например, SEQ ID NO: 126 или SEQ ID NO: 138), домен Ib (например, SEQ ID NO: 127 или SEQ ID NO: 139) или домен III (например, SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 140) экзотоксина (например, Cholix или PE).

[252] В рамках настоящего изобретения носитель, в котором «отсутствует» домен

II, домен Ib и домен III экзотоксина (например, Cholix и/или PE), может все-таки содержать часть домена II, домена Ib или домена III экзотоксина или их комбинацию. Таким образом, термин «с отсутствующим» в рамках настоящего изобретения означает, что носитель не содержит полный домен II, полный домен Ib или полный домен III. Носитель может содержать не более 70% аминокислотных остатков домена II, домена Ib или домена III экзотоксина. Например, носитель может содержать домен I Cholix (например, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5) или его усеченный вариант и дополнительно содержать аминокислотные остатки 1-82 домена II Cholix (SEQ ID NO: 126). Носитель может содержать не более 60% аминокислотных остатков домена II, домена Ib или домена III экзотоксина. Носитель может содержать не более 50% аминокислотных остатков домена II, домена Ib или домена III экзотоксина. Носитель может содержать не более 25% аминокислотных остатков домена II, домена Ib или домена III экзотоксина. Носитель может содержать не более 10% аминокислотных остатков домена II, домена Ib или домена III экзотоксина.

[253] В настоящем раскрытии представлены носители, полученные из выделенных не существующих в природе и бактериальных токсинов (например, полученные из экзотоксина), которые можно соединить с грузом (например, биологически активным); причем носитель способен доставлять груз (например, биологически активный) во внутреннюю часть эпителиальной клетки, такую как внутриклеточная везикула или компартмент или цитозоль. Области и/или компартменты во внутренней части эпителиальной клетки могут включать в себя области и/или компартменты на апикальной стороне внутренней части эпителиальной клетки, области и/или компартменты на базальной стороне внутренней части эпителиальной клетки, супрануклеарные области эпителиальной клетки или любые их комбинации. Эпителиальная клетка может быть поляризованной эпителиальной клеткой кишечника. Поляризованная эпителиальная клетка кишечника может быть частью монослоя поляризованных эпителиальных клеток (например, содержащего клетки Caco-2), или она может быть частью эпителия кишечника субъекта (например, грызуна или человека).

[254] Носитель может быть получен из бактериального носителя, такого как экзотоксин (например, Cholix и/или PE), и может быть получен из домена I указанного экзотоксина и может не содержать домен II (например, SEQ ID NO: 126 или SEQ ID NO: 138), домен Ib (например, SEQ ID NO: 127 или SEQ ID NO: 139) или домен III (например, SEQ ID NO: 128 или SEQ ID NO: 140) экзотоксина (например, Cholix или PE). Носитель может содержать рецепторсвязывающий домен или связывающий фрагмент, который может представлять собой домен, область или фрагмент внутри полученного из экзотоксина домена I и который обеспечивает связывание конструкции доставки с одним или более селективными или неселективными рецепторами на просветной поверхности эпителиальной клетки. Рецептором может быть селективный рецептор или неселективный рецептор, такой как неселективный скэвенджер-рецептор на просветной поверхности эпителиальных клеток кишечника. Один или более рецепторов, с которыми носитель

может взаимодействовать на поверхности эпителиальной клетки и/или во время эндоцитоза, могут содержать белок 1, связанный с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP1), или трансмембранный белок 132 (TMEM132). Таким образом, конструкция доставки может связываться с одним или более рецепторами клеточной поверхности, которые могут присутствовать на апикальной мембране эпителиальной клетки с достаточной аффинностью, чтобы обеспечить эндоцитоз. Конструкция доставки может связываться с любым рецептором, который, как известно специалисту в данной области, присутствует на апикальной мембране эпителиальной клетки без ограничения. Носитель может связываться с LRP1. Носитель может связываться с TMEM132. Альтернативно, носитель может связываться с LRP1 и TMEM132.

[255] Носитель можно получить из домена I экзотоксина. Экзотоксин выбирают из группы, состоящей из Cholix и PE. Носитель, который описан в настоящей заявке, получен из домена I экзотоксина, причем экзотоксином является Cholix. Таким образом, носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать аминокислотную последовательность, которая получена из этого домена I Cholix (например, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5). Домен I Cholix (например, SEQ ID NO: 4) может содержать аминокислоты 1-265 SEQ ID NO: 1, или он может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (например, при получении бактериально содержит N-концевой метиониновый остаток) и может быть описан как «рецепторсвязывающий домен», который функционирует в качестве лиганда для рецептора клеточной поверхности и опосредует связывание и эндоцитоз Cholix. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 50% гомологией с любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 60% гомологией с любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 70% гомологией с любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 80% гомологией с любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 90% гомологией с любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 95% гомологией с любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125. В аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 можно произвести консервативные или не консервативные замены. Как описано в настоящей заявке, замена аминокислотного остатка будет идентифицирована посредством ссылки на конкретную аминокислотную замену в конкретном аминокислотном остатке. Таким образом, например, термин «S30A» означает, что остаток «S» (серин в стандартном однобуквенном коде) в позиции 30 в SEQ ID NO: 4 был заменен на «A» (аланин в стандартном однобуквенном коде), а модифицированный носитель будет идентифицирован как «Cholix^{S30A}». Носитель может представлять собой усеченный вариант последовательности домена I Cholix SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Таким образом, носитель, содержащий усеченный вариант домена I Cholix, может содержать аминокислотную

последовательность по любой из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 125. Носитель может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125, причем один или более аминокислотных остатков такой последовательности удалены. Носитель может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125, причем один или более аминокислотных остатков можно заменить другой аминокислотой. Как описано в настоящей заявке, усеченный носитель можно идентифицировать посредством ссылки на аминокислотные остатки, содержащие усеченный токсин, например, усеченный носитель Cholix, состоящий из аминокислотных остатков 1-260 SEQ ID NO: 4, будет идентифицирован как $Cholix^{260}$ и так далее, согласно номенклатуре, описанной в настоящей заявке.

[256] Иллюстративные нуклеотидные и аминокислотные последовательности носителей, которые описаны в настоящей заявке, показаны ниже в таблице **2**. В разных вариантах осуществления носитель содержит любую из аминокислотных последовательностей, показанных в таблице **2** или ее фрагмент или комбинацию.

ТАБЛИЦА 2 - Иллюстративные Нуклеотидные и Аминокислотные Последовательности Носителей

SEQ ID NO	**Последовательность**
SEQ ID NO: 1	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKГNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT QVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHG YARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYE ELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 2	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKГNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA

	QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT QVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHG YARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYE ELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 3	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKΓNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT QVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYV FVGYHGTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHG YARIKEGTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEE HITQVIGHSLPLRNEAFTGPESAGGEDATVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAY EELAIDEEAVAKEQSISTKPPYKERKDELK
SEQ ID NO: 4	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSK
SEQ ID NO: 5	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE QNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGI EQKPVEQRIHFSK
SEQ ID NO: 6	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE

	QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQ
SEQ ID NO: 7	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE QNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQ
SEQ ID NO: 8	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK
SEQ ID NO: 9	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE QNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPK
SEQ ID NO: 10	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL
SEQ ID NO: 11	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE QNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT GL
SEQ ID NO: 12	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTG
SEQ ID NO: 13	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT

SEQ ID NO: 14	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWH
SEQ ID NO: 15	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHW
SEQ ID NO: 16	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAH
SEQ ID NO: 17	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWA
SEQ ID NO: 18	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRW
SEQ ID NO: 19	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKR
SEQ ID NO: 20	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHK
SEQ ID NO: 21	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRH
SEQ ID NO: 22	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY

	NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSR
SEQ ID NO: 23	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGS
SEQ ID NO: 24	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEG
SEQ ID NO: 25	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKE
SEQ ID NO: 26	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQK
SEQ ID NO: 27	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQ
SEQ ID NO: 28	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAA
SEQ ID NO: 29	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKA
SEQ ID NO: 30	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK

SEQ ID NO: 31	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 32	EEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 33	EALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 34	ALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 35	LNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 36	NIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 37	IFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 38	FDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 39	DECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFA

	INWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 40	ECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓ ESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAI NWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGN VSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 41	CRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓE SIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAIN WLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNV SFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 42	RSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESI ITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINW LVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSF SVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 43	SPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESII TIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINW LVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSF SVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 44	PCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLV PIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSV TRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 45	CSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITI GEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLV PIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSV TRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 46	SLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIG EFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTR PEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 47	LTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGE FATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPI GEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTR PEHNIAISWPSVSYK

SEQ ID NO: 48	TPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEF ATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIG EDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRP EHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 49	PEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFA TVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGE DSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPE HNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 50	EPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFAT VRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGED SPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEH NIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 51	PGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATV RATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSP ASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNI AISWPSVSYK
SEQ ID NO: 52	GKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVR ATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPA SIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIA ISWPSVSYK
SEQ ID NO: 53	KPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRA TRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPAS IKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI SWPSVSYK
SEQ ID NO: 54	PIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRAT RHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASI KISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAIS WPSVSYK
SEQ ID NO: 55	IQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKI SVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISW PSVSYK
SEQ ID NO: 56	QSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATR HYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKI

	SVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 57	SKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 58	KLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 59	LSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 60	SIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 61	IPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 62	PSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 63	SDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 64	DVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 65	VVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQ

	RNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 66	VLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPF GVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQR NIIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 67	LDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFG VIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRN IIEVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 68	DEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGV IHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 69	EGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVI HLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII EVPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 70	GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIH LDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIE VPKLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 71	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSY
SEQ ID NO: 72	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVS
SEQ ID NO: 73	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSV
SEQ ID NO: 74	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPS
SEQ ID NO: 75	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY

	NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWP
SEQ ID NO: 76	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISW
SEQ ID NO: 77	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAIS
SEQ ID NO: 78	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAI
SEQ ID NO: 79	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIA
SEQ ID NO: 80	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNI
SEQ ID NO: 81	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHN
SEQ ID NO: 82	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEH
SEQ ID NO: 83	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPE

SEQ ID NO: 84	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRP
SEQ ID NO: 85	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTR
SEQ ID NO: 86	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVT
SEQ ID NO: 87	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSV
SEQ ID NO: 88	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFS
SEQ ID NO: 89	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSF
SEQ ID NO: 90	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVS
SEQ ID NO: 91	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNV
SEQ ID NO: 92	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY

	NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGN
SEQ ID NO: 93	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQG
SEQ ID NO: 94	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQ
SEQ ID NO: 95	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKT
SEQ ID NO: 96	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWK
SEQ ID NO: 97	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QW
SEQ ID NO: 98	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE Q
SEQ ID NO: 99	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE
SEQ ID NO: 100	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTL
SEQ ID NO: 101	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY

	NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQT
SEQ ID NO: 102	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQ
SEQ ID NO: 103	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDN
SEQ ID NO: 104	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLD
SEQ ID NO: 105	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDL
SEQ ID NO: 106	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID
SEQ ID NO: 107	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE QNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSID
SEQ ID NO: 108	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSI
SEQ ID NO: 109	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYS
SEQ ID NO: 110	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLY
SEQ ID NO: 111	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKL
SEQ ID NO: 112	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPK

SEQ ID NO: 113	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
SEQ ID NO: 114	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEV
SEQ ID NO: 115	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIE
SEQ ID NO: 116	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNII
SEQ ID NO: 117	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNI
SEQ ID NO: 118	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRN
SEQ ID NO: 119	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQR
SEQ ID NO: 120	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQ
SEQ ID NO: 121	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQ
SEQ ID NO: 122	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELD
SEQ ID NO: 123	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEL
SEQ ID	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ

NO: 124	NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDE
SEQ ID NO: 125	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE QNDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDE
SEQ ID NO: 126	GNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVSLFVAT RILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVARQIY NDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
SEQ ID NO: 127	ADILSLFCPDADKSCVASNNDQANINIESRSGRSYLPEN
SEQ ID NO: 128	RAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTNHVAAQTIVNRI APVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGEYGLPTRAER DARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPLRNEAFTGP ESAGGEDETVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAKEQSISTKPP YKERKDELK
SEQ ID NO: 129	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKΓNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT QVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIESRSGRSYLPEN
SEQ ID NO: 130	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKΓNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT QVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASN NDQANINIES
SEQ ID	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ

NO: 131	NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKΓNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT QVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDA
SEQ ID NO: 132	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKΓNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQA QNIVSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVT QVLTVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQA
SEQ ID NO: 133	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKΓESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSY NRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLE QWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGL ALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQ KPVEQRIHFSKΓNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKP
SEQ ID NO: 134	GTCGAAGAAGCTTTAAACATCTTTGATGAATGCCGTTCGCCATGTTCG TTGACCCCGGAACCGGGTAAGCCGATTCAATCAAAACTGTCTATCCCT AGTGATGTTGTTCTGGATGAAGGTGTTCTGTATTACTCGATGACGATTA ATGATGAGCAGAATGATATTAAGGATGAGGACAAAGGCGAGTCCATT ATCACTATTGGTGAATTTGCCACAGTACGCGCGACTAGACATTATGTT AATCAAGATGCGCCTTTTGGTGTCATCCATTTAGATATTACGACAGAA AATGGTACAAAAACGTACTCTTATAACCGCAAAGAGGGTGAATTTGCA ATCAATTGGTTAGTGCCTATTGGTGAAGATTCTCCTGCAAGCATCAAA ATCTCCGTTGATGAGCTCGATCAGCAACGCAATATCATCGAGGTGCCT AAACTGTATAGTATTGATCTCGATAACCAAACGTTAGAGCAGTGGAAA ACCCAAGGTAATGTTTCTTTTTCGGTAACGCGTCCTGAACATAATATCG CTATCTCTTGGCCAAGCGTGAGTTACAAAGCAGCGCAGAAAGAGGGTT CACGCCATAAGCGTTGGGCTCATTGGCATACAGGCTTAGCACTGTGTT GGCTTGTGCCAATGGATGCTATCTATAACTATATCACCCAGCAAAATT

	GTACTTTAGGGGATAATTGGTTTGGTGGCTCTTATGAGACTGTTGCAG GCACTCCGAAGGTGATTACGGTTAAGCAAGGGATTGAACAAAAGCCA GTTGAGCAGCGCATCCATTTCTCCAAGGGGAATGCGATGAGCGCACTT GCTGCTCATCGCGTCTGTGGTGTGCCATTAGAAACTTTGGCGCGCAGT CGCAAACCTCGTGATCTGACGGATGATTTATCATGTGCCTATCAAGCG CAGAATATCGTGAGTTTATTTGTCGCGACGCGTATCCTGTTCTCTCATC TGGATAGCGTATTTACTCTGAATCTTGACGAACAAGAACCAGAGGTGG CTGAACGTCTAAGTGATCTTCGCCGTATCAATGAAAATAACCCGGGCA TGGTTACACAGGTTTTAACCGTTGCTCGTCAGATCTATAACGATTATGT CACTCACCATCCGGGCTTAACTCCTGAGCAAACCAGTGCGGGTGCACA AGCTGCCGATATCCTCTCTTTATTTTGCCCAGATGCTGATAAGTCTTGT GTGGCTTCAAACAACGATCAAGCCAATATCAACATCGAGTCTCGTTCT GGCCGTTCATATTTGCCTGAAAACCGTGCGGTAATCACCCCTCAAGGC GTCACAAATTGGACTTACCAGGAACTCGAAGCAACACATCAAGCTCTG ACTCGTGAGGGTTATGTGTTCGTGGGTTACCATGGTACGAATCATGTC GCTGCGCAAACCATCGTGAATCGCATTGCCCCTGTTCCGCGCGGCAAC AACACTGAAAACGAGGAAAAGTGGGGCGGGTTATATGTTGCAACTCA CGCTGAAGTTGCCCATGGTTATGCTCGCATCAAAGAAGGGACAGGGG AGTATGGCCTTCCGACCCGTGCTGAGCGCGACGCTCGTGGGGTAATGC TGCGCGTGTATATCCCTCGTGCTTCATTAGAACGTTTTTATCGCACGAA TACACCTTTGGAAAATGCTGAGGAGCATATCACGCAAGTGATTGGTCA TTCTTTGCCATTACGCAATGAAGCATTTACTGGTCCAGAAAGTGCGGG CGGGGAAGACGAAACTGTCATTGGCTGGGATATGGCGATTCATGCAGT TGCGATCCCTTCGACTATCCCAGGGAACGCTTACGAAGAATTGGCGAT TGATGAGGAGGCTGTTGCAAAAGAGCAATCGATTAGCACAAAACCAC CTTATAAAGAGCGCAAAGATGAACTTAAG
SEQ ID NO: 135	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMV LEGGNDALKLAIДHKLSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSL NWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDAT FFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEБЫIJGKVLCLL DPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRL HFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAES ERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPT GAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVERLLQAHRQLEERGYVFVGYHGTFLE

	AAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIR NGALLRVYVPRSSLPGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGP EEEGGRLETILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALP DYASQPGKPPREDLK
SEQ ID NO: 136	GCCGAGGAAGCCTTCGACCTCTGGAACGAATGCGCCAAGGCCTGCGT GCTCGACCTCAAGGACGGCGTGCGTTCCAGCCGCATGAGCGTCGACCC GGCCATCGCCGACACCAACGGCCAGGGCGTGCTGCACTACTCCATGGT CCTGGAGGGCGGCAACGACGCGCTCAAGCTGGCCATCGACAACGCCC TCAGCATCACCAGCGACGGCCTGACCATCCGCCTCGAAGGTGGCGTCG AGCCGAACAAGCCGGTGCGCTACAGCTACACGCGCCAGGCGCGCGGC AGTTGGTCGCTGAACTGGCTGGTGCCGATCGGCCACGAGAAGCCTTCG AACATCAAGGTGTTCATCCACGAACTGAACGCCGGTAACCAGCTCAGC CACATGTCGCCGATCTACACCATCGAGATGGGCGACGAGTTGCTGGCG AAGCTGGCGCGCGATGCCACCTTCTTCGTCAGGGCGCACGAGAGCAAC GAGATGCAGCCGACGCTCGCCATCAGCCATGCCGGGGTCAGCGTGGTC ATGGCCCAGGCCCAGCCGCGCCGGGAAAAGCGCTGGAGCGAATGGGC CAGCGGCAAGGTGTTGTGCCTGCTCGACCCGCTGGACGGGGTCTACAA CTACCTCGCCCAGCAGCGCTGCAACCTCGACGATACCTGGGAAGGCAA GATCTACCGGGTGCTCGCCGGCAACCCGGCGAAGCATGACCTGGACAT CAAGCCCACGGTCATCAGTCATCGCCTGCATTTCCCCGAGGGCGGCAG CCTGGCCGCGCTGACCGCGCACCAGGCCTGCCACCTGCCGCTGGAGAC CTTCACCCGTCATCGCCAGCCGCGCGGCTGGGAACAACTGGAGCAGTG CGGCTATCCGGTGCAGCGGCTGGTCGCCCTCTACCTGGCGGCGCGGCT GTCGTGGAACCAGGTCGACCAGGTGATCCGCAACGCCCTGGCCAGCCC CGGCAGCGGCGGCGACCTGGGCGAAGCGATCCGCGAGCAGCCGGAGC AGGCCCGTCTGGCCCTGACCCTGGCCGCCGCCGAGAGCGAGCGCTTCG TCCGGCAGGGCACAGGCAACGACGAGGCCGGCGCGGCCAGCGCCGAC GTGGTGAGCCTGACCTGCCCGGTCGCCGCCGGTGAATGCGCGGGCCCG GCGGACAGCGGCGACGCCCTGCTGGAGCGCAACTATCCCACTGGCGC GGAGTTCCTCGGCGACGGCGGCGACATCAGCTTCAGCACCCGCGGCAC GCAGAACTGGACGGTGGAGCGGCTGCTCCAGGCGCACCGCCAACTGG AGGAGCGCGGCTATGTGTTCGTCGGCTACCACGGCACCTTCCTCGAAG CGGCGCAAAGCATCGTCTTCGGCGGGGTGCGCGCGCGCAGCCAGGAC CTCGACGCGATCTGGCGCGGTTTCTATATCGCCGGCGATCCGGCGCTG GCCTACGGCTACGCCCAGGACCAGGAACCCGACGCGCGCGGCCGGAT

	CCGCAACGGTGCCCTGCTGCGGGTCTATGTGCCGCGCTCGAGTCTGCC GGGCTTCTACCGCACCGGCCTGACCCTGGCCGCGCCGGAGGCGGCGG GCGAGGTCGAACGGCTGATCGGCCATCCGCTGCCGCTGCGCCTGGACG CCATCACCGGCCCCGAGGAGGAAGGCGGGCGCCTGGAAACCATTCTC GGCTGGCCGCTGGCCGAGCGCACCGTGGTGATTCCCTCGGCGATCCCC ACCGACCCGCGCAACGTCGGCGGCGACCTCGACCCGTCCAGCATCCCC GACAAGGAACAGGCGATCAGCGCCCTGCCGGACTACGCCAGCCAGCC CGGCAAACCGCCGCGCGAGGACCTGAAG
SEQ ID NO: 137	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMV LEGGNDALKLAIДHKLSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSL NWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDAT FFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEБЫЛGKVLCLL DPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRL HFPE
SEQ ID NO: 138	GGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVALYLAA RLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAESERFV RQGTGNDEAGAAS
SEQ ID NO: 139	ADVVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPTGAEFLGDG
SEQ ID NO: 140	GDVSFSTRGTQNWTVERLLQAHRQLEERGYVFVGYHGTFLEAAQSIVFG GVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQDQEPDARGRIRNGALLRVY VPRSSLPGFYRTGLTLAAPEAAGEVERLIGHPLPLRLDAITGPEEEGGRLET ILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPDKEQAISALPDYASQPGK PPREDLK
SEQ ID NO: 141	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMV LEGGNDALKLAIДHKLSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSL NWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDAT FFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEБЫЛGKVLCLL DPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRL HFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAES ERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYPT GAEFLGDG
SEQ ID NO: 142	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMV LEGGNDALKLAIДHKLSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSL

	NWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDAT FFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEБЫЛGKVLCLL DPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRL HFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAES ERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVAAGECAGPADSGDALLERNYP
SEQ ID NO: 143	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMV LEGGNDALKLAIДHKLSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSL NWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDAT FFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEБЫЛGKVLCLL DPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRL HFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAES ERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVA
SEQ ID NO: 144	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMV LEGGNDALKLAIДHKLSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSL NWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDAT FFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEБЫЛGKVLCLL DPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRL HFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCGYPVQRLVAL YLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQARLALTLAAAES ERFVRQGTGNDEAGAAS
SEQ ID NO: 145	AEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSMV LEGGNDALKLAIДHKLSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSWSL NWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARDAT FFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQAQPRREKRWSEБЫЛGKVLCLL DPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISHRL HFPEGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQ
SEQ ID NO: 146	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDE QNDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYS YNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQT LEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHT GLALCWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGI EQKPVEQRIHFSKГGGSLAALTAHQACHLPLETFTRHRQPRGWEQLEQCG YPVQRLVALYLAARLSWNQVDQVIRNALASPGSGGDLGEAIREQPEQAR

	LALTLAAAESERFVRQGTGNDEAGAASADVVSLTCPVAAGECAGPADSG DALLERNYPTGAEFLGDGGDVSFSTRGTQNWTVERLLQAHRQLEERGYV FVGYHGTFLEAAQSIVFGGVRARSQDLDAIWRGFYIAGDPALAYGYAQD QEPDARGRIRNGALLRVYVPRSSLPGFYRTSLTLAAPEAAGEVERLIGHPL PLRLDAITGPEEEGGRLTILGWPLAERTVVIPSAIPTDPRNVGGDLDPSSIPD KEQAISALPDYASQPGKPPREDLK
SEQ ID NO: 147	MAEEAFDLWNECAKACVLDLKDGVRSSRMSVDPAIADTNGQGVLHYSM VLEGGNDALKLAIДHKLSITSDGLTIRLEGGVEPNKPVRYSYTRQARGSW SLNWLVPIGHEKPSNIKVFIHELNAGNQLSHMSPIYTIEMGDELLAKLARD ATFFVRAHESNEMQPTLAISHAGVSVVMAQTQPRREKRWSEБЫЛGKVLC LLDPLDGVYNYLAQQRCNLDDTWEGKIYRVLAGNPAKHDLDIKPTVISH RLHFPEGGNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNI VSLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVL TVARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAAEILSLFCPDADKSCVATNNDQ ANINIESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVG YTNHVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKE GTGEYGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIG HSLPLRNEAFTGPESAGGEDTVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEE AVAKEQSISTKPPYKERKDELK

[257] Носителем может быть полипептид, который получен из экзотоксина Cholix и имеющий: не более 5 аминокислотных остатков; не более 10 аминокислотных остатков; не более 15 аминокислотных остатков; не более 20 аминокислотных остатков; не более 30 аминокислотных остатков; не более 40 аминокислотных остатков; не более 50 аминокислотных остатков; не более 60 аминокислотных остатков; не более 70 аминокислотных остатков; не более 80 аминокислотных остатков; не более 90 аминокислотных остатков; не более 100 аминокислотных остатков; не более 110 аминокислотных остатков; не более 120 аминокислотных остатков; не более 130 аминокислотных остатков; не более 140 аминокислотных остатков; не более 150 аминокислотных остатков; не более 160 аминокислотных остатков; не более 170 аминокислотных остатков; не более 180 аминокислотных остатков; не более 190 аминокислотных остатков; не более 200 аминокислотных остатков; не более 210 аминокислотных остатков; не более 220 аминокислотных остатков; не более 230 аминокислотных остатков; не более 240 аминокислотных остатков; не более 250 аминокислотных остатков; не более 260 аминокислотных остатков; и не более 265 аминокислотных остатков SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Рецепторсвязывающим доменом бактериального носителя может быть полипептид, полученный из Cholix и имеющий по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%

или более гомологию последовательностей с SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Носителем может быть полипептид, полученный из Cholix и имеющий не более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% гомологию последовательностей с любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 133. Аминокислотные остатки могут быть последовательными. Аминокислотные остатки также могут быть не последовательными. Носитель можно получить из домена I экзотоксина Cholix. Носитель, который получен из домена I экзотоксина, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель, который получен из домена I экзотоксина, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель, который получен из домена I экзотоксина, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель, который получен из домена I экзотоксина, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель, который получен из домена I экзотоксина, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

[258] Носитель может быть искусственно синтезирован. Носителем может быть искусственно синтезированный полипептид, имеющий по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более гомологию аминокислотных последовательностей с доменом I Cholix (например, любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125). Носителем может быть синтетический полипептид, имеющий не более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% гомологию аминокислотных последовательностей с доменом I Cholix (например, любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125). Полипептид, из которого может состоять носитель, можно синтезировать с использованием твердофазного синтеза.

[259] Носителем может быть полипептид, полученный из Cholix и имеющий не более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% гомологию последовательностей с любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125. Некоторые фрагменты в аминокислотной последовательности носителя могут иметь специфические функции, которые могут быть связаны с одним или более аспектами процесса трансцитоза. Эти

функции могут включать в себя прохождение монослоя поляризованных первичных эпителиальных клеток тонкого кишечника человека или интактного эпителия кишечника, обеспечивая или способствуя эндоцитозу в эпителиальную клетку, апикально-базальной транспортировке, высвобождению конструкции доставки из базальной мембраны в базолатеральный компартмент, доставке во внутриклеточную везикулу или компартмент или цитозоль эпителиальной клетки и/или доставке в супрануклеарную область эпителиальной клетки (например, поляризованной эпителиальной клетки кишечника).

[260] Таким образом, в настоящем раскрытии представлены носители, которые могут иметь разные функции (например, одно или несколько из эндоцитоза, трансцитоза, внутриклеточной доставки и т.д.). Такой носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Такой носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 (например, домена I Cholix, экспрессированного в клетке млекопитающего) или SEQ ID NO: 5 (например, домена I Cholix, экспрессированного в бактериальной клетке). Такой носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Носитель, раскрытый в настоящей заявке, может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или ее функциональный фрагмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 или ее функциональный фрагмент.

[261] Функциональный носитель согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Носитель может содержать содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Носитель может иметь пространственную структуру, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 148 или SEQ ID NO: 149 находятся в непосредственной близости с одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 151, а один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 148 или SEQ ID NO: 149 находятся в непосредственной близости с одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 152.

[262] Носитель согласно настоящему раскрытию может быть способен доставлять груз через эпителиальную клетку (например, поляризованную эпителиальную клетку). Такой носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью

SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может дополнительно содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-187 или 1-205 SEQ ID NO: 10 или 1-186 или 1-206 SEQ ID NO: 11. Носитель может содержать остатки 1-186 SEQ ID NO: 30 или 1-187 SEQ ID NO: 31 и не более 206 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

[263] Способы и композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать носитель, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. В некоторых случаях носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или ее функциональный фрагмент.

[264] Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Такой носитель может быть способен доставлять груз во внутриклеточное местоположение. Таким внутриклеточным местоположением может быть супрануклеарная область. Такой носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или по

меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-151 или 1-187 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

[265] В способах и композициях согласно настоящему раскрытию представлен носитель, в котором может отсутствовать любые один или более аминокислотных остатков 1-39 SEQ ID NO: 5 или аминокислотных остатков 1-38 SEQ ID NO: 4. Такой носитель может быть способен доставлять груз во внутриклеточное местоположение посредством эндоцитоза. Таким местоположением может быть апикальная область или компартмент. у носителя могут отсутствовать все аминокислотные остатки 1-39 SEQ ID NO: 5 или аминокислотные остатки 1-38 SEQ ID NO: 4. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70 или 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70 или 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 70 или 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать остатки 1-151 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-150 SEQ ID NO: 4 и не более 187 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

[266] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать усеченный вариант домена I Cholix. Таким образом, носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Такой носитель может быть способен доставлять груз во внутриклеточное местоположение посредством эндоцитоза. Таким местоположением может быть апикальная и/или базальная область или компартмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 30

- SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или ее функциональный фрагмент.

[267] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Такой носитель может быть способен доставлять груз во внутриклеточное местоположение посредством эндоцитоза. Таким местоположением может быть апикальная область или компартмент. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может дополнительно содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-151 SEQ ID NO: 6 или одного или более аминокислотных остатков 1-150 SEQ ID NO: 7. Носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать остатки 1-134 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-133 SEQ ID NO: 4 и не более 151 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 106 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее

функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 106 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 106 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 106 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или ее функциональный фрагмент.

[268] Носитель согласно настоящему раскрытию можно получить из домена I экзотоксина. Экзотоксином может быть Cholix. Носитель, который получен из домена I Cholix, может содержать по меньшей мере одну, но не более 20 бета цепей. Носитель, который получен из домена I Cholix, может содержать по меньшей мере одну, но не более 15 бета цепей. Носитель, который получен из домена I Cholix, может содержать от 10 до 15 бета цепей. Носитель, который получен из домена I Cholix, может содержать по меньшей мере одну, но менее чем 10 α-спиралей. Носитель, который получен из домена I Cholix, может содержать от 1 до 5 α-спиралей.

[269] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотный фрагмент домена I Cholix, который может обеспечивать, способствовать и/или усиливать апикальное поступление носителя, полученного из Cholix, в эпителиальные клетки, такие как поляризованные эпителиальные клетки кишечника. Такой фрагмент может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 148 и может способствовать и/или усиливать апикальное поступление носителя, полученного из Cholix, в эпителиальные клетки на апикальной поверхности эпителия/просвета. Это может усиливать функцию доставки и/или транспортировки носителя и увеличивать количество грузовых молекул, доставляемых и/или транспортируемых в эпителиальную клетку и/или через нее.

[270] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотный фрагмент домена I Cholix, который может обеспечивать, способствовать и/или усиливать апикально-базальный трансцитоз полученного из Cholix носителя, который описан в настоящей заявке. Такой аминокислотный фрагмент, который обеспечивает, способствует и/или усиливает апикально-базальный трансцитоз конструкции доставки, может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 149 или SEQ ID NO: 150. Это может усиливать функцию доставки и/или транспортировки носителя и увеличивать количество грузовых молекул, доставляемых

и/или транспортируемых в эпителиальную клетку и/или через нее. Например, носитель, содержащий такой фрагмент с SEQ ID NO: 149 или SEQ ID NO: 150, может увеличить количество грузовых молекул, доставляемых и/или транспортируемых в базальный компартмент. Это может дополнительно усиливать базальное высвобождение носителя.

[271] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотный фрагмент домена I Cholix, который может обеспечивать, способствовать и/или усиливать раннюю и/или позднюю эндосомную сортировку, таким образом обеспечивая, способствуя и/или усиливая транспортировку полученного из Cholix носителя в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки. Такой пептидный фрагмент домена I Cholix, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 151, и может обеспечивать, способствовать и/или усиливать раннюю эндосомную сортировку полученной из Cholix конструкции доставки, которая описана в настоящей заявке. Супрануклеарные области, которые могут стать мишенью при использовании такого носителя, могут включать в себя эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и/или эндосомы. Таким образом, носитель, способный обеспечить доступ в такую область, может обеспечить эффективную доставку груза в такие области.

[272] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотный фрагмент домена I Cholix, который может обеспечивать, способствовать и/или усиливать полный трансцитоз полученной из Cholix конструкции доставки через интактный эпителиальный слой, такой как эпителий кишечника. Такой фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 152, может обеспечивать, способствовать и/или усиливать полный трансцитоз полученной из Cholix конструкции доставки путем обеспечения базального высвобождения носителя и/или конструкции доставки из эпителиальной клетки. Полный трансцитоз полученной из Cholix конструкции доставки можно определить, например, путем измерения наличия конструкции доставки в базолатеральном компартменте или собственной пластинке. Способность таких носителей доставлять груз через слои интактных эпителиальных клеток может иметь большое значение, так как это обеспечивает пероральное введение лекарственных средств, которые сами были бы не способны проходить такие эпителиальные слои.

[273] В рамках настоящего изобретения в настоящем раскрытии представлено неожиданное открытие, что носителя, который получен из домена I Cholix и у которого отсутствует домен II Cholix, домен Ib и домен III, достаточно для быстрого и эффективного апикально-базального трансцитоза (например, достаточно для быстрой и эффективной апикально-базальной транспортировки груза посредством трансцитоза). Кроме того, показано, что некоторые части аминокислотной последовательности домена I Cholix могут иметь специфические функции, связанные с апикально-базальным трансцитозом через эпителиальную клетку и/или доставкой в цитозоль или внутрь эпителиальной клетки. Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125.

Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать один или более функциональных аминокислотных пептидных фрагментов домена I Cholix SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать домен I Cholix с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 и/или SEQ ID NO: 5.

[274] В настоящем раскрытии дополнительно представлены носители, которые содержат один или более функциональных фрагментов домена I Cholix. Функциональные фрагменты могут располагаться в том же порядке, что и в зрелой аминокислотной последовательности Cholix, или функциональные фрагменты могут располагаться в другом порядке без нарушения функции (функций) таких функциональных фрагментов. Таким образом, носитель может содержать одну или несколько функциональных аминокислотных последовательностей, полученных из домена I Cholix и приведенных в SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Такие аминокислотные последовательности могут быть связаны вместе с образованием полимерного полипептида, содержащего множество полученных из домена I Cholix пептидных фрагментов. Такой носитель согласно настоящему раскрытию может содержать одну или несколько аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152 или любые их комбинации, которые образуют полимерный полипептид, способный к эффективному трансцитозу через эпителиальные слои, такие как эпителий кишечника. Такой полимерный пептид может содержать множество аминокислотных фрагментов, полученных из домена I Cholix, и такой полимерный полипептид можно использовать вместо и/или в дополнение к полипептиду домена I Cholix или его усеченному варианту. Такой не существующий в природе синтетический полимерный пептид может обладать превосходными или худшими способностями к трансцитозу при использовании в качестве конструкции доставки по сравнению с доменом I Cholix или его усеченным вариантом. Функциональность таких синтетических полипептидов может зависеть от нескольких факторов, таких как пространственная структура и геометрия, стабильность и/или груз, который можно соединить с таким полипептидом.

[275] Носитель согласно настоящему раскрытию не может значительно изменяться химическим, структурным и/или конформационным образом во время процесс трансцитоза через эпителиальную клетку. Таким образом, полученный из токсина Cholix носитель, который раскрыт в настоящей заявке (включая полимерные пептиды, содержащие множество полученных из Cholix аминокислотных фрагментов) можно использовать в качестве эффективного средства доставки для различных грузовых молекул (например, терапевтических грузовых молекул), которые описаны в настоящей заявке. Полученный из Cholix носитель, который описан в настоящей заявке, не содержит домены II и III, но вместо этого соединен с одним или более грузовыми фрагментами (например, терапевтическими грузовыми молекулами) без уменьшения способностей транспортировки и/или трансцитоза по сравнению со зрелым ntChx.

[276] Транспортировка носителя, который описан в настоящей заявке, через эпителиальный слой (например, эпителий кишечника) может включать в себя множество

стадий. Транспортировка конструкции доставки (например, полученной из Cholix конструкции доставки) может включать элементы функционирования домена I Cholix в многостадийном процессе. Например, транспортировка или трансцитоз может включать апикальный эндоцитоз, везикулярную транспортировку, включающую апикальные, базальные и/или супрануклеарные области энтероцитов, и высвобождение из базальной мембраны для достижения собственной пластинки. Кроме того, полученная из Cholix конструкция доставки, которая описана в настоящей заявке, может использовать опосредованный рецептором тип процесса эндоцитоза. Опосредованный рецептором эндоцитоз может включать в себя аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 148 или ее фрагментом или производным, которые могут обеспечить доступ в ранний эндосомный везикулярный компартмент в апикальной части энтероцитов, например, посредством эндоцитоза. Аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 151 или ее фрагментом или производным, может обеспечивать, способствовать или усиливать перемещение полученной из Cholix конструкции доставки в супрануклеарную область, соответствующую участку сортировки в клетке для явлений секреции. Перемещение конструкции доставки, содержащей полученный из Cholix носитель, в базальный компартмент клеток может быть более эффективным, когда носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 149 или SEQ ID NO: 150 или ее фрагментом или производным. Аминокислотная последовательность, имеющая по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 149, ее фрагментом или производным, может обеспечить механизм секреции из базальной мембраны, при которой высвобождается интактная и функциональная конструкция доставки (например, содержащая грузовой фрагмент) в базолатеральный компартмент или в собственную пластинку, откуда она может достигать разных других мест (например, клеток, тканей или органов) в организме (например, человека или грызуна).

[277] В дополнение к тому, что носитель во время трансцитоза остается неизменным или немодифицированным, транспортировка конструкции доставки, которая раскрыта в настоящей заявке, через эпителиальный барьер (например, интактный эпителий кишечника) обычно не включает в себя интоксикацию или разрушение энтероцитов. Таким образом, конструкция доставки, которая раскрыта в настоящей заявке, может содержать домен I Cholix, его фрагмент или усеченный вариант (например, любую из SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 125) или полимерный пептид, содержащий множество аминокислотных фрагментов, полученных из домена I Cholix (например, SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152), и при этом другие домены (например, домены II, домен Ib и III) можно заменить различными другими фрагментами, такими как спейсеры,

гетерологичные грузы (например, терапевтический и/или биологически активный груз), малые молекулы, нуклеиновые кислоты (например, аптамеры или интерферирующие РНК) или любые их комбинации как описано дальше в настоящей заявке.

[278] Носитель согласно настоящему раскрытию можно использовать для эффективной доставки различных грузовых молекул в эпителиальные клетки и/или через них, например, при содержании аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125). Таким образом, носитель согласно настоящему раскрытию может обеспечить эффективный эндоцитоз на апикальном участке и транспортировку во внутреннюю часть эпителиальной клетки (например, энтероцита и/или поляризованной эпителиальной клетки кишечника), такую как внутриклеточная везикула или компартмент или цитозоль и/или супрануклеарная область. Такой носитель может содержать аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 125. Таким образом, конструкции доставки грузовых молекул в эпителиальные клетки могут содержать усеченный домен I Cholix или фрагмент домена I Cholix, который не содержит аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 151 и/или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 152 или любых их комбинаций.

[279] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать один или более потенциальных сайтов гликозилирования. Один или более сайтов гликозилирования могут находиться в домене I Cholix (например, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5). Носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, в которой аспарагиновые остатки N98, N154, N165, N224 или любые их комбинации могут быть потенциальными сайтами гликозилирования. Вариант или мутация одного или более этих аминокислотных остатков, которые могут выступать в качестве сайтов гликозилирования, могут затрагивать или снижать функцию, связанную с трансцитозом конструкции доставки. В **таблице 3** представлены иллюстративные функциональные пептидные фрагменты домена I Cholix, которые были идентифицированы, чтобы обеспечить одну или несколько функций, связанных с апикально-базальным трансцитозом.

ТАБЛИЦА 3 - иллюстративные Функциональные пептидные фрагменты, полученные из домена I Cholix

SEQ ID NO	**Аминокислотная последовательность**
SEQ ID NO: 148	ELDQQRNIIEVPKLYSID
SEQ ID NO: 149	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD
SEQ ID NO: 150	VEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD
SEQ ID NO: 151	DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK
SEQ ID NO: 152	KAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL

Как описано дальше в настоящей заявке, носитель согласно настоящему

раскрытию может содержать один или более функциональных фрагментов. Такие функциональные фрагменты могут включать в себя фрагменты, перечисленные в таблице **3**. Таким образом, носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с одной или несколькими аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать по меньшей мере одну из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать по меньшей мере две аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать по меньшей мере три аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать по меньшей мере четыре аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать все аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152. Таким образом, носитель, который описан в настоящей заявке, может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или ее функциональный фрагмент.

[280] В рамках настоящего изобретения домен I экзотоксина PE (SEQ ID NO: 137) содержит аминокислоты 1-252 SEQ ID NO: 135 и был описан как «рецепторсвязывающий домен», который функционирует в качестве лиганда рецептора клеточной поверхности и опосредует связывание PE в клетке. Таким образом, носитель согласно настоящему раскрытию может быть получен из PE и может содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 50% гомологией с SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 60% гомологией с SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 70% гомологией с SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 80% гомологией с SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 90% гомологией с SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность с более 95% гомологией с SEQ ID NO: 137. Кроме того, с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7 можно

произвести консервативную или неконсервативную замены при условии, что не будет существенно затронута способность опосредовать связывание конструкции доставки в клетке. Носитель может содержать рецепторсвязывающий домен, который представляет собой усеченный вариант SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, в котором удалены один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, в котором один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 137 заменены другой аминокислотой.

[281] Носитель согласно настоящему раскрытию, который получен из домена I PE, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 80% идентичность с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-252 SEQ ID NO: 137. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

[282] Носитель (например, рецепторсвязывающий домен бактериального носителя) согласно настоящему раскрытию может представлять собой полипептид, полученный из PE и имеющий: не более 5 аминокислотных остатков; не более 10 аминокислотных остатков; не более 15 аминокислотных остатков; не более 20 аминокислотных остатков; не более 30 аминокислотных остатков; не более 40 аминокислотных остатков; не более 50 аминокислотных остатков; не более 60 аминокислотных остатков; не более 70 аминокислотных остатков; не более 80 аминокислотных остатков; не более 90 аминокислотных остатков; не более 100 аминокислотных остатков; не более 110 аминокислотных остатков; не более 120 аминокислотных остатков; не более 130 аминокислотных остатков; не более 140 аминокислотных остатков; не более 150 аминокислотных остатков; не более 160 аминокислотных остатков; не более 170 аминокислотных остатков; не более 180 аминокислотных остатков; не более 190 аминокислотных остатков; не более 200 аминокислотных остатков; не более 210

аминокислотных остатков; не более 220 аминокислотных остатков; не более 230 аминокислотных остатков; не более 240 аминокислотных остатков; не более 250 аминокислотных остатков; не более 260 аминокислотных остатков; и не более 265 аминокислотных остатков SEQ ID NO: 137. Рецепторсвязывающим доменом бактериального носителя может быть полипептид, полученный из PE и имеющий по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более гомологию последовательностей с SEQ ID NO: 137. Рецепторсвязывающим доменом бактериального носителя может быть полипептид, полученный из PE и имеющий не более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% гомологию последовательностей с SEQ ID NO: 137. Аминокислотные остатки могут быть последовательными. Аминокислотные остатки можно не последовательными.

[283] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать связывающий домен, который представляет собой искусственно синтезированный полипептид, имеющий по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более гомологию аминокислотных последовательностей с доменом I PE. Носитель, содержащий рецепторсвязывающий домен, может представлять собой синтетический полипептид, имеющий не более 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% гомологию аминокислотных последовательностей с доменом I PE SEQ ID NO: 137. Полипептид можно синтезировать с использованием твердофазного синтеза или рекомбинантной экспрессии.

[284] Носитель согласно настоящему раскрытию, способный доставлять груз через эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки), может содержать полипептид рецепторсвязывающего домена (например, домен I или его производное), в котором один или более аминокислотных остатков полипептида рецепторсвязывающего домена одного бактериального носителя заменены одним или более аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя (также упоминается в настоящей заявке как «гибридный полипептид рецепторсвязывающего домена»). Например, носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 4 заменены одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 137. Альтернативно, носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 137 заменены одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 4. Кроме того, такой носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой аминокислотные остатки 77-87 SEQ ID NO: 4 (Cholix) заменены аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя (например, домена I PE). Носитель может содержать аминокислотную последовательность, в которой аминокислотные остатки 188-236 SEQ ID NO: 4 заменены аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя. Носитель может содержать аминокислотную

последовательность, в которой аминокислотные остатки 69-71 SEQ ID NO: 137 заменены аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя. Носитель может также содержать аминокислотную последовательность, в которой аминокислотные остатки 177-228 SEQ ID NO: 137 заменены аминокислотными остатками полипептида рецепторсвязывающего домена второго бактериального носителя. Таким образом, носитель согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более гомологию последовательностей с SEQ ID NO: 4 и по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% или более гомологию последовательностей с SEQ ID NO: 137.

[285] Носитель согласно настоящему раскрытию, который получен из домена I экзотоксина, может дополнительно содержать часть транслокационного домена экзотоксина или элементы модифицированного транслокационного домена. транслокационный домен может представлять собой домен II экзотоксина. Носитель согласно настоящему раскрытию, который получен из домена I экзотоксина, может дополнительно содержать часть нетоксичного каталитического домена или элементы модифицированного нетоксичного каталитического домена. Нетоксичный каталитический домен может представлять собой модифицированный домен III экзотоксина, например, тот, что содержит один или более вариантов аминокислот и/или делецию одного или более аминокислотных остатков, делающих домен III нетоксичным (например, замену E581A (например, SEQ ID NO: 3) или делецию ΔE581). транслокационный домен или модифицированный транслокационный домен и нетоксичный каталитический домен или модифицированный нетоксичный каталитический домен можно получить из одного и того же бактериального токсина. Альтернативно, транслокационный домен или модифицированный транслокационный домен и нетоксичный каталитический домен или модифицированный нетоксичный каталитический домен можно получить из бактериального носителя, выбираемого из группы, состоящей из носителя Cholix (Cholix) и экзотоксина Pseudomonas (PE), ботулотоксина, дифтерийного токсина, коклюшного токсина, холерного токсина, термолабильного энтеротоксина E. coli, токсина шига и шигаподобного токсина.

[286] В рамках настоящего изобретения домен II Cholix (SEQ ID NO: 126) содержит аминокислоты 266-386 SEQ ID NO: 1). Носитель согласно настоящему раскрытию может представлять собой носитель, полученный из Cholix, содержащий полную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126, или может содержать часть (части) SEQ ID NO: 126. Кроме того, можно произвести консервативную или неконсервативную замены SEQ ID NO: 126. В настоящей заявке описан типовой анализ, который может стандартно использовать специалист в данной области для определения, обладает ли трансцитозный домен трансцитозной активностью. Носитель может содержать по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по

меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% аминокислотных остатков полной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 126. Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать усеченный домен II Cholix, например, тот, который идентифицирован как $Cholix^{425}$ (SEQ ID NO: 129), $Cholix^{415}$ (SEQ ID NO: 130), $Cholix^{397}$ (SEQ ID NO: 131), $Cholix^{386}$ (SEQ ID NO: 132), $Cholix^{291}$ (SEQ ID NO: 133) и $Cholix^{265}$ (SEQ ID NO: 4).

[287] В рамках настоящего изобретения домен II PE (SEQ ID NO: 138) содержит аминокислоты 253-364 SEQ ID NO: 135). Носитель согласно настоящему раскрытию может представлять собой носитель PE, содержащий полную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137, или может содержать часть (части) SEQ ID NO: 137. Например, в настоящей заявке показано, что аналогично домену I экзотоксина Cholix домена I PE может быть достаточно для быстрого и эффективного апикально-базального трансцитоза. Таким образом, как описано выше, для полученных из Cholix носителей часть (части) домена II PE можно использовать в качестве спейсера для присоединения дополнительного полезного груза, такого как гетерологичный груз. Кроме того, можно произвести консервативную или неконсервативную замены SEQ ID NO: 137. В настоящей заявке описан типовой анализ, который может стандартно использовать специалист в данной области для определения, обладает ли трансцитозный домен трансцитозной активностью. В рамках настоящего изобретения трансцитозная активность не будет существенно затронута при условии, что активность составляет, например, по меньшей мере 1%, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по сравнению с носителем PE, содержащим полную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 137. Таким образом, носитель согласно настоящему раскрытию может содержать усеченный домен II PE, например, тот, что идентифицирован как PE^{404} (SEQ ID NO: 141), PE^{395} (SEQ ID NO: 142), PE^{376} (SEQ ID NO: 143), PE^{364} (SEQ ID NO: 144), PE^{277} (SEQ ID NO: 145) и PE^{252} (SEQ ID NO: 146).

[288] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать рецепторсвязывающий домен и транслокационный домен (например, домен II) или модифицированный транслокационный домен (например, модифицированный домен II) и может дополнительно содержать нетоксичный каталитический домен (например, домен III) или модифицированный нетоксичный каталитический домен (например, модифицированный домен III). Нетоксичный каталитический домен или модифицированный нетоксичный каталитический домен можно получить из бактериального носителя, выбираемого из группы, состоящей из носителя Cholix (Cholix) и экзотоксина Pseudomonas (PE), ботулотоксина, дифтерийного токсина, коклюшного

токсина, холерного токсина, термолабильного энтеротоксина E. coli, токсина шига и шигаподобного токсина. В разных вариантах осуществления транслокационный домен или модифицированный транслокационный домен и нетоксичный каталитический домен или модифицированный нетоксичный каталитический домен получают из одного и того же бактериального токсина.

[289] В рамках настоящего изобретения домен III Cholix (SEQ ID NO: 128) содержит аминокислоты 426-634 SEQ ID NO: 1 и был описан как каталитический домен, ответственный за цитотоксичность, и содержит последовательность удержания в эндоплазматическом ретикулуме. Домен III опосредует ADP-рибозилирование фактора элонгации 2 («EF2»), который инактивирует синтез белка. Носитель, у которого «отсутствует активность эндогенного ADP-рибозилирования» или «детоксифицированный Cholix», относится к любому носителю, полученному из Cholix, описанному в настоящей заявке (включая модифицированные варианты), который не содержит полную аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128 (например, часть домена III). Такой носитель может содержать одну или несколько модификаций в SEQ ID NO: 128 таким образом, чтобы детоксифицировать молекулу. Например, делеция остатка глутаминовой кислоты (Glu) в позиции аминокислоты 156 SEQ ID NO: 128 детоксифицирует молекулу. В разных вариантах осуществления часть SEQ ID NO: 128, отличную от сигнала удержания в ER, можно заменить другой аминокислотной последовательностью. Эта аминокислотная последовательность сама может быть неиммуногенной, слабо иммуногенной или высокоиммуногенной. Высокоиммуногенный домен удержания в ER является предпочтительным для применения с целью индукции гуморального иммунного ответа. Например, домен III Cholix сам по себе является высокоиммуногенным, и его можно использовать в конструкциях доставки, где нужен устойчивый гуморальный иммунный ответ.

[290] В рамках настоящего изобретения домен III PE (SEQ ID NO: 140) содержит аминокислоты 405-613 SEQ ID NO: 3) и был описан как каталитический домен, ответственный за цитотоксичность и содержит последовательность удержания в эндоплазматическом ретикулуме. Домен III опосредует ADP-рибозилирование фактора элонгации 2 («EF2»), который инактивирует синтез белка. Полученный из PE носитель, у которого «отсутствует активность эндогенного ADP-рибозилирования», или «детоксифицированный PE» относится к любому PE, описанному в настоящей заявке (включая модифицированные варианты или производные), который не содержит SEQ ID NO: 140 и/или который был модифицирован в SEQ ID NO: 140 таким образом, чтобы детоксифицировать молекулу. Например, делеция остатка глутаминовой кислоты (Glu) в позиции аминокислоты 149 SEQ ID NO: 140 детоксифицирует молекулу. В разных вариантах осуществления часть домена III PE, отличную от сигнала удержания в ER, можно заменить другой аминокислотной последовательностью. Эта аминокислотная последовательность сама может быть неиммуногенной, слабо иммуногенной или высокоиммуногенной. Высокоиммуногенный домен удержания в ER является

предпочтительным для применения с целью индукции гуморального иммунного ответа. Например, домен III PE сам по себе является высокоиммуногенным, и его можно использовать в конструкциях доставки, где нужен устойчивый гуморальный иммунный ответ.

[291] В настоящем раскрытии представлены носители, которые могут содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, имеющего аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 137, транслокационный домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 138, и нетоксичный каталитический домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 140. В настоящем раскрытии представлены носители, которые могут содержать полипептид рецепторсвязывающего домена, имеющего аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, транслокационный домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 126, и нетоксичный каталитический домен, имеющий аминокислотную последовательность, полученную из последовательности SEQ ID NO: 128.

[292] В дополнение к носителям, содержащим домен I и/или части домена II и домена III экзотоксина, в настоящем раскрытии представлены носители, которые могут содержать домен I Cholixb (SEQ ID NO: 127) или его часть. Домен I Cholixb (SEQ ID NO: 127) состоит из аминокислот 387-425 SEQ ID NO: 1. Таким образом, носитель, который получен из домена I экзотоксина, может дополнительно содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 127 или модифицированную последовательность, усеченную в аминокислотном остатке в SEQ ID NO: 127. Описанный в настоящей заявке домен Ib PE (SEQ ID NO: 139) состоит из аминокислот 365-404 SEQ ID NO: 135. Таким образом, полученный из PE носитель, который содержит рецепторсвязывающий домен и транслокационный домен или модифицированный транслокационный домен и нетоксичный каталитический домен или модифицированный нетоксичный каталитический домен, может дополнительно содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или модифицированную последовательность, усеченную в аминокислотном остатке в SEQ ID NO: 139.

[293] Носитель согласно настоящему раскрытию может содержать часть (части) одного или более домена II, домена Ib или домена III, причем эти части (например, некоторые их аминокислотные последовательности) могут быть частью спейсера, как описано дальше в настоящей заявке.

[294] В способах и композициях согласно настоящему раскрытию представлены носители, которые могут содержать первую часть и вторую часть, причем первую часть получают из первого экзотоксина, а вторую часть получают из второго экзотоксина; и при этом носитель можно соединить с грузом (например, гетерологичным грузом, таким как биологически активный груз). Первым экзотоксином может быть Cholix, а вторым

экзотоксином может быть PE. Первую часть можно получить из домена I, домена II, домена Ib или домена III Cholix или любых их комбинаций. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 133, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Вторую часть можно получить из домена I, домена II, домена Ib или домена III PE или любых их комбинаций. Вторая часть может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 145, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации. Первую часть можно химически соединить или рекомбинантно соединить со второй частью. Кроме того, первую часть можно прямо или непрямо соединить со второй частью. Такой носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147.

[295] Обычно, носитель согласно настоящему раскрытию может содержать полипептид, причем полипептид может содержать по меньшей мере 110 аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 120 аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 130 аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 140 аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 150 аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 50 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 60 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 75 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 100 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина. Носитель может содержать по меньшей мере 150 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина.

[296] В способах и композициях согласно настоящему раскрытию представлены носители, которые могут содержать одну или более модификаций на N-конце. Такая модификация может содержать по меньшей мере один N-концевой метиониновый остаток. По меньшей мере один N-концевой метиониновый остаток может быть частью N-

кэпа, которая описана в настоящей заявке. Носитель, содержащий N-кэп, может дополнительно содержать один или более вариантов аминокислот в первых 5-10 аминокислотных остатках по сравнению с эталонными последовательностями. Таким образом, один или более первых N-концевых аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 можно заменить на другие аминокислотные остатки при условии, что консенсусная последовательность, которая может определять функцию Cholix, не изменится. В дополнение к таким вариантам аминокислот описанный в настоящей заявке носитель, содержащий N-кэп, может дополнительно содержать N-концевой метиониновый остаток. N-кэп также может содержать только добавление N-концевого метионинового остатка. Иллюстративные носители согласно настоящему раскрытию, которые содержат такой N-кэп (например, дополнительный N-концевой метионин), представлены в любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125. Как описано в настоящей заявке, функциональные варианты такого носителя могут содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

[297] Обычно и как описано дальше в настоящей заявке, «Cholix» (также упоминаемый в настоящей заявке как токсин Cholix или экзотоксин Cholix) может охватывать множество функциональных вариантов (например, функциональный род), причем функциональные варианты могут содержать один или более вариантов своей аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 1, как раскрыто в настоящей заявке. Таким образом, в настоящем раскрытии токсин Cholix, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, использован в качестве эталонной последовательности при упоминании Cholix. Однако, как описано в настоящей заявке, настоящее раскрытие не ограничено Cholix, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, но вместо этого охватывает все варианты Cholix, которые попадают в функциональный род Cholix. Например, первый полипептид домена I Cholix (например, первый носитель) может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, а второй полипептид домена I Cholix (например, второй носитель) может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, причем как первый полипептид, так и второй полипептид способны выполнять одинаковые функции, например, трансцитоз через эпителиальную клетку, и взаимодействовать с одинаковыми рецепторами, такими как рибофилин 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и/или перлекан. Как описано в настоящей заявке, первый носитель и второй носитель можно получить в одной и той же системе экспрессии (например, системе экспрессии бактерий, такой как E. coli, или системе экспрессии млекопитающих, такой как клетка CHO). В других случаях и как описано в настоящей заявке, первый носитель и второй носитель получают в разных системах экспрессии

(например, системах экспрессии бактерий или млекопитающих).

[298] Носитель согласно настоящему раскрытию может иметь свойства, которые обеспечивают взаимодействия с эндогенными рецепторами и/или обеспечивают доступ к эндогенной системе транспортировки и трансцитоза. Таким образом, носитель согласно настоящему раскрытию, который получен из домена I Cholix и содержит аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125 или SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152, может взаимодействовать с одним или более эндогенными рецепторами. Такие эндогенные рецепторы могут содержать TMEM132A, GPR75, ERGIC-53 и/или перлекан и любые их комбинации. Такое взаимодействие (взаимодействия) может обеспечить (например, апикально-базальный) трансцитоз через эпителиальную клетку и/или транспортировку во внутреннюю часть эпителиальной клетки. Эти взаимодействия обеспечивают быструю и эффективную доставку. Эти взаимодействия дополнительно обеспечивают механизмы транспортировки, которые могут не изменять носитель клетки, в которую или через которую доставляется или транспортируется носитель. Например, носители, описанные в настоящей заявке, не показывают каких-либо химических модификаций при высвобождении из базальной мембраны эпителиальной клетки, что позволяет предположить, что носители согласно настоящему раскрытию могут использовать одну или несколько эндогенных систем транспортировки для доставки груза в эпителиальные клетки и/или через них. Рецепторы, с которыми может взаимодействовать носитель и/или конструкция доставки, содержащая носитель, включают в себя, но без ограничения, любой из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана или любые их комбинации. Например, взаимодействие носителя и/или конструкции доставки, содержащей носитель, с ERGIC-53 (также называемым LAMN1) может быть неотъемлемой частью процесса эндоцитоза и/или трансцитоза, поскольку этот рецептор является единственным взаимодействующим белком, который может нарушить свое клеточное распределение после введения носителя в просвет. Кроме того и как показано в настоящей заявке, ERGIC-53 (LAMN1) участвует в ненаправленном ретроградном пути из комплекса Гольджи в ER, что позволяет предположить, что это может быть путь, описанный как эффективный, так и быстрый.

[299] В настоящем раскрытии представлены способы и композиции, содержащие носители, которые обеспечивать быструю и эффективную транспортировку и доставку груза через клетки, такие как эпителиальные клетки. Носитель, который описан в настоящей заявке, может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки от приблизительно 10^{-10} см/сек до приблизительно 10^{-2} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки от приблизительно 10^{-9} см/сек до приблизительно 10^{-3} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки от приблизительно 10^{-8} см/сек до приблизительно 10^{-4} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки от приблизительно 10^{-7} см/сек до приблизительно 10^{-5} см/сек. Носитель может

транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки от приблизительно 10^{-6} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки по меньшей мере 10^{-8} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки по меньшей мере 10^{-7} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки по меньшей мере 10^{-6} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки по меньшей мере 10^{-5} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки по меньшей мере 10^{-4} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки по меньшей мере 10^{-3} см/сек. Носитель может транспортировать груз через эпителиальную клетку со скоростью транспортировки по меньшей мере 10^{-2} см/сек.

Конструкции доставки

[300] в способах и композициях согласно настоящему раскрытию представлены молекулы носителя, которые быстро и эффективно транспортируют груз в эпителиальные клетки и/или через них. Доставку и/или транспортировку груза можно обеспечить путем связывания груза с носителем, который описан в настоящей заявке. Такая конструкция может называться в настоящей заявке как «конструкция доставки». Как описано в настоящей заявке, в настоящем раскрытии представлены носители, которые могут содержать малую молекулу, полипептид, аптамер, их фрагменты или любые их комбинации. Как описано в настоящей заявке, носитель можно получить из экзотоксина. Экзотоксином может быть Cholix или PE. Носитель можно соединить прямо или непрямо с грузом. Носитель можно ковалентно или нековалентно соединить с грузом. Таким образом, конструкция доставки может дополнительно содержать спейсер, который связывает носитель с грузом. Спейсером может быть любая молекула, которая связывает носитель с грузом, и он может представлять собой олигомерные или полимерные спейсеры (например, полиэтиленгликоль и т.д.) и аминокислоты. Кроме того, конструкцию доставки, содержащую носитель, соединенный с грузом, и необязательно спейсер и/или другой функциональный фрагмент, можно получить синтетически или рекомбинантно (например, в E. coli или клетке CHO).

[301] В рамках настоящего изобретения термины «конструкции доставки», «полученные из токсинов конструкции доставки», «химерные конструкции», «белки» и «белки слияния» могут использоваться взаимозаменяемо и могут относится к конструкциям, содержащим по меньшей мере один домен доставки или носителя (например, носителя, полученного из домена I Cholix или PE, малой молекулы, аптамера или любых их комбинаций) и по меньшей мере одну гетерологичную грузовую молекулу, такую как терапевтическая грузовая молекула. термин «гетерологичный груз» может упоминаться как несвязанный с этими экзотоксинами. Как описано дальше в настоящей заявке, токсичность (например, интоксикация энтероцитов) бактериального носителя (например, Cholix или PE) может не являться необходимым требованием для эффективной

транспортировки носителя через интактные эпителиальные слои, такие как эпителий кишечника. Вместо этого в настоящей заявке показано, что носителя, который получен из домена I (например, усеченного варианта домена I) экзотоксина, такого как Cholix и PE, достаточно для быстрого и эффективного трансцитоза через эпителиальную клетку (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника).

[302] Обычно, конструкция доставки (например, выделенная конструкция доставки) содержит носитель, который обеспечивает быструю и эффективную доставку и/или транспортировку груза в определенное место, причем местом может быть орган, ткань, клетка или клеточный компартмент. Грузовую молекулу можно прямо или непрямо соединить с носителем. Грузом, который соединяют с носителем, может быть гетерологичный груз (например, полученный не из самого носителя). Таким образом, конструкция доставки, описанная в настоящей заявке, может содержать носитель, соединенный с гетерологичным грузом. Носитель может иметь некоторые функции, которые обеспечивают быструю и эффективную транспортировку груза в какое-то место, например, место внутри эпителиальной клетки или место (места) в базолатеральном компартменте. Носитель, представленный в настоящей заявке, можно получить из экзотоксина. Экзотоксином может быть Cholix или PE. Носитель, который получен из Cholix, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с SEQ ID NO: 1 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Надо отметить, что Cholix (также упоминаемый в настоящей заявке как токсин Cholix или экзотоксин Cholix) может охватывать множество функциональных вариантов (например, функциональный род), причем функциональные варианты могут включать в себя один или более вариантов своей аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 1, как раскрыто в настоящей заявке. Таким образом, в настоящем раскрытии токсин Cholix, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, использован в качестве эталонной последовательности при упоминании Cholix. Однако, как описано в настоящей заявке, настоящее раскрытие не ограничено Cholix, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, но вместо этого охватывает все варианты Cholix, которые попадают в функциональный род Cholix. Например, первый полипептид домена I Cholix (например, первый носитель) может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, а второй полипептид домена I Cholix (например, второй носитель) может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, причем как первый полипептид, так и второй полипептид способны выполнять одинаковые функции, например, трансцитоз через эпителиальную клетку, и взаимодействовать с одинаковыми рецепторами, такими как рибофилин 1, SEC24 (также может называться компонент комплекса покрытия COPII), цитокератин-8 (CK-8), трансмембранный белок 132 (TMEM132), регулируемый глюкозой белок 75 (GRP75), промежуточный компартмент Гольджи эндоплазматического ретикулума 53 (ERGIC-53, число 53 может относиться к его молекулярной массе приблизительно 53 кДа) и/или

перлекан (также называемый базальный мембраноспецифический коровый белок гепарансульфат-протеогликана или HSPG). Как описано в настоящей заявке, первый носитель и второй носитель можно получить в одной и той же системе экспрессии (например, системе экспрессии бактерий, такой как E. coli, или системе экспрессии млекопитающих, такой как клетка CHO). Как описано в настоящей заявке, первый носитель и второй носитель можно получить в разных системах экспрессии (например, системах экспрессии бактерий или млекопитающих).

[303] Важно, что конструкции доставки, представленные в настоящей заявке, могут обеспечить преимущества по сравнению с обычными способами доставки. Такие преимущества могут включать в себя, но без ограничения: a) помощь в получении конструкции доставки; b) помощь в повторной укладке химерной конструкции; c) помощь в составлении конструкции доставки; d) помощь в уменьшении чувствительности груза к протеолитическому разрушению; e) повышение стабильности конструкции доставки во время хранения; f) в вариантах осуществления, где элементы бактериального носителя домена I соединены с гетерологичным (например, биологически активным) грузом без спейсера или с нерасщепляемым спейсером, элементы бактериального носителя домена I могут функционировать для удержания химеры в выбранных местах организма после трансцитоза, что приводит к большему воздействию биологически активного (или диагностического) груза на конкретные клетки, чтобы обеспечить улучшенную фармакодинамику; g) в вариантах осуществления, где элементы бактериального носителя домена I соединены с гетерологичным (например, биологически активным) грузом спейсером, который представляет собой расщепляемый фермент, присутствующий на базолатеральной мембране эпителиальной клетки, или фермент, присутствующий в плазме субъекта, такое расщепление обеспечит высвобождение гетерологичного (например, биологически активного) груза из остальной части конструкции вскоре после трансцитоза через эпителиальную мембрану; h) прямую доставку гетерологичного груза во внутреннюю часть эпителиальной клетки, такую как внутриклеточная везикула или компартмент или цитозоль или супрануклеарная область эпителиальной клетки; i) прямая доставка гетерологичного (например, биологически активного) груза в подслизистое пространство желудочно-кишечного тракта и воротную систему печени может снижать системную токсичность, наблюдаемую при введении груза посредством парентеральных путей, а также обеспечить доступ к целевым особенностям под слизистой оболочкой, на которые было бы трудно воздействовать посредством непероральных или GI путей; j) за счет использования механизмов эндогенной транспортировки и доставки конструкции доставки, раскрытые в настоящей заявке, не повреждают эпителиальный слой; k) после переноса через эпителий GI, конструкция доставки или биологически активный груз будет демонстрировать увеличенный период полужизни в сыворотке по сравнению с биологически активным грузом в неслитом состоянии; l) пероральное введение конструкции доставки может доставлять повышенную эффективную концентрацию доставленного биологически активного груза в печень субъекта чем наблюдается в плазме

субъекта; и m) способность доставлять биологически активный груз субъекту без использования иглы для прокола кожи субъекта, улучшая таким образом качество жизни таких субъектов, избегая боли или возможных связанных с этим осложнений, в дополнение к улучшению удобства для пациента/лица, осуществляющего уход, и соблюдения режима лечения.

[304] В настоящем раскрытии представлены способы и композиции для доставки и транспортировки грузовых молекул через эпителиальную клетку (например, посредством трансцитоза) и/или во внутреннюю часть эпителиальной клетки. Способы и композиции, раскрытые в настоящей заявке, могут содержать конструкцию доставки, причем конструкция доставки содержит носитель, соединенный с гетерологичным грузом (например, посредством спейсера). Способы транспортировки и доставки, описанные в настоящей заявке, с использованием носителей согласно настоящему раскрытию могут включать в себя эндоцитоз на апикальной стороне эпителиальной клетки. В зависимости от того, выполнен ли носитель с возможностью доставки груза в эпителиальную клетку или через нее, способы транспортировки могут включать в себя высвобождение конструкции доставки на базальной стороне. Кроме того, в транспортировке груза в эти разные места могут участвовать различные механизмы. Например, доставка груза во внутриклеточную везикулу или компартмент или цитозоль эпителиальной клетки может включать в себя высвобождение конструкции доставки, содержащей носитель, соединенный с этим грузом, из везикулы во внутриклеточную везикулу или компартмент или цитозоль. В качестве другого примера трансцитоз конструкции доставки может включать в себя везикулярный трансцитоз и в связи с этим может включать в себя инкапсуляцию конструкции доставки в везикуле во время трансцитоза таким образом, чтобы конструкция доставки могла контактировать или не контактировать с внутриклеточным цитозолем.

[305] Способы и композиции согласно настоящему раскрытию могут включать в себя доставку груза в определенное место таким образом, чтобы груз оставался в этом месте в течение некоторого количества времени. Например, грузовую молекулу можно сохранять во внутриклеточном или базолатеральном местоположении, которое является мишенью при использовании композиций, описанных в настоящей заявке. Удержание может обеспечить вызов с помощью грузовой молекулы определенного ответа или биологического действия (например, терапевтического эффекта). Таким образом, в настоящем раскрытии представлены способы и композиции, которые обеспечивают доставку груза в какое-то место в эпителиальной клетке или через нее, так чтобы конструкция доставки (и груз) оставалась в этом месте в течение определенного количества времени. Такое удерживание можно модулировать, например, путем обеспечения расщепления груза из носителя или путем обеспечения обратимого или необратимого связывания носителем определенного белка (например, рецептора), который находится в этом месте.

[306] Конструкции доставки согласно настоящему раскрытию могут содержать

носитель, причем носитель может быть выполнен с возможностью нацеливания на определенное место внутри эпителиальной клетки или через нее. Таким местом может быть орган, ткань, клетка или клеточный компартмент. Путем нацеливания на такие места, способы и композиции, описанные в настоящей заявке, можно использовать для различных вариантов применения, например, тех, которые включают в себя доставку груза через интактную эпителиальную мембрану in vitro или in vivo.

[307] В рамках настоящего изобретения носитель можно соединить с гетерологичным грузом любым способом, описанным в настоящей заявке. Конструкция доставки содержит носитель, который соединяют с гетерологичным грузом посредством спейсера. Спейсер может содержать любой фрагмент, приведенный в настоящей заявке, и может содержать любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 166 - SEQ ID NO: 213. Спейсер может представлять собой расщепляемый спейсер. Спейсером может быть нерасщепляемый спейсер. Спейсер может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210 или ее фрагмент или производное.

[308] Обычно и как описано в настоящей заявке, любой носитель, раскрытый в настоящей заявке (например, те, что перечислены в таблице 2 и таблице **3**) можно комбинировать с любой из грузовых молекул, описанных в настоящей заявке (например, теми, что перечислены в таблице **11** и таблице **12**), и, необязательно, с любым спейсером, описанным в настоящей заявке (например, теми, что перечислены в таблицах **7-10** и теми, что имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 207 - SEQ ID NO: 213) с образованием конструкции доставки. Таким образом, носитель, описанный в настоящей заявке, можно получить из экзотоксина. Носитель можно получить из домена I экзотоксина. Экзотоксином может быть Cholix или PE. Конструкция доставки, представленная в настоящей заявке, может содержать носитель, полученный из Cholix, причем носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125, соединенный с гетерологичным грузом. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125. Носитель может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125. Экзотоксином, из которого можно получить носитель, может быть PE. Таким образом, конструкция доставки содержит носитель, который может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137, или ее функциональный фрагмент, соединенный с гетерологичным грузом.

[309] Иллюстративные конструкции доставки, которые описаны в настоящем раскрытии, показаны ниже в таблице **4**.

ТАБЛИЦА 4 - Аминокислотные последовательности иллюстративных конструкций доставки

SEQ ID NO	**Аминокислотная последовательность**
SEQ ID NO: 153	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL CWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKГNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIV SLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTV ARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLF ДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPS NREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLL KDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYC FRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 154	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL CWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKГNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIV SLFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTV ARQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAGGGGSGGGGSGGGGSMHSSALLC CLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFFQMK DQLDNLLLKESLLEDFKГYLGCQALSEMIQFYLEEVMPQAENQDPDIKAHV NSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKГIYKAMS EFDIFINYIEAYMTMKIRN

SEQ ID NO: 155	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL CWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKГGGGSGGGGSGGGGSMAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLV QGGAAAPISSHCRLDKSNFQQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKL FHGVSMSERCYLMKQVLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLS TCHIEGDDLHIQRNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 156	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL CWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKMRSSKNVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNT VKLKVTKГGPLPFAWDILSPQFQYGSKVYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWE RVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGCFIYKVKФИГVNFPSDGPVMQKKTMG WEASTERLYPRDGVLKГEIHKALKLKDGGHYLVEFKSIYMAKKPVQLPGY YYVDSKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRHHLFL
SEQ ID NO: 157	VEDELNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQN DIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNR KEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQW KTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALC WLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVE QRIHFSKГNAMSALAAHRVCGVPLETLARSRKPRDLTDDLSCAYQAQNIVS LFVATRILFSHLDSVFTLNLDEQEPEVAERLSDLRRINENNPGMVTQVLTVA RQIYNDYVTHHPGLTPEQTSAGAQAADILSLFCPDADKSCVASNNDQANIN IESRSGRSYLPENRAVITPQGVTNWTYQELEATHQALTREGYVFVGYHGTN HVAAQTIVNRIAPVPRGNNTENEEKWGGLYVATHAEVAHGYARIKEGTGE YGLPTRAERDARGVMLRVYIPRASLERFYRTNTPLENAEEHITQVIGHSLPL RNEAFTGPESAGGEDATVIGWDMAIHAVAIPSTIPGNAYEELAIDEEAVAK EQSISTKPPYKERKDELKMRSSKNVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEG EGRPYEGHNTVKLKVTKГGPLPFAWDILSPQFQYGSKVYVKHPADIPDYK KLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGCFIYKVKФИГVNFPSDG PVMQKKTMGWEASTERLYPRDGVLKГEIHKALKLKDGGHYLVEFKSIYM

	AKKPVQLPGYYYVDSKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRHHLFL
SEQ ID NO: 158	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDEGGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLF ДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPS NREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLL KDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYC FRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 159	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDGGGGSGGG GSGGGGSFPTIPLSRLFДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFL QNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFAN SLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNS HNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 160	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKГGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRL FДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTP SNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDL LKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLY CFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 161	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLGG GGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPK EQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQF LRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTY SKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 162	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL

	CWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKГGGGSGGGGSGG GGSFPTIPLSRLFДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQ TSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVY GASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDD ALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 163	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL CWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGGGGSG GGGSGGGGSFPTIPLSRLFДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKY SFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSV FANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFD TNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO: 164	MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQ NDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYN RKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVPKLYSIDLDNQTLEQ WKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL CWLVPMDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPV EQRIHFSKГGGGSGGGGSGGGGSFPTIPLSRLFДHKMLRAHRLHQLAFDTY QEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLI QSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPR TGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRS VEGSCGF
SEQ ID NO: 165	GVLYYSMTINDEQNDIKDEDKГESIITIGEFATVRATRHYVNQDAPFGVIHL DITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAGGGGSGGG GSGGGGSFPTIPLSRLFДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFL QNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFAN SLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNS HNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF

[310] Способы и композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать конструкцию доставки, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165 или имеющую по

меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165 или имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165 или имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165 или имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом. Конструкция доставки может содержать аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 153 - SEQ ID NO: 165 или имеющую 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

[311] Иллюстративные комбинации различных носителей, спейсеров и гетерологичных грузов, которые могут образовать конструкцию доставки, которая описана в настоящей заявке, показаны ниже в таблице **5**.

ТАБЛИЦА 5 - Иллюстративные Конструкции доставки

Носитель (SEQ ID NO)	**Спейсер (SEQ ID NO)**	**Биологически Активный груз (SEQ ID NO)**
SEQ ID NO: 4-5	Без спейсера	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 4-5	SEQ ID NO: 187-206	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 4-5	SEQ ID NO: 207-211	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 137	Без спейсера	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 187-206	SEQ ID NO: 214-220
SEQ ID NO: 137	SEQ ID NO: 207-211	SEQ ID NO: 214-220

[312] Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию может взаимодействовать с одним или более конкретными белками, ферментом или рецепторами во время транспортировки и/или доставки через эпителиальную клетку и/или во внутреннюю часть эпителиальной клетки (например, поляризованной эпителиальной клетки кишечника). Один или более рецепторов могут представлять собой эндогенные рецепторы. Таким образом, в конструкциях доставки согласно настоящему раскрытию можно использовать системы эндогенных рецепторов, которые обеспечивают быструю эффективную транспортировку и доставку груза через эпителиальную клетку или интактный эпителий (например, монослой клеток Caco-2 и/или интактный эпителий кишечника субъекта) и/или во внутреннюю часть эпителиальной клетки эпителия.

Конструкции доставки, содержащие носитель, содержащий аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 125, могут обеспечить доставку и транспортировку гетерологичного (например, терапевтически или биологически активного) груза во внутреннюю часть эпителиальной клетки, например, к базальной стороне эпителиальной клетки, и/или в супрануклеарную область (например, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и/или эндосому) эпителиальной клетки. Внутренней частью эпителиальной клетки может быть внутриклеточная везикула или компартмент или цитозоль эпителиальной клетки. Груз (например, гетерологичный груз) можно доставлять к базальной стороне эпителиальной клетки (например, в какое-то место или компартмент на базальной стороне). Гетерологичный груз можно доставлять в супрануклеарную область эпителиальной клетки. Транспортировка конструкции доставки во внутреннюю часть эпителиальной клетки может включать в себя высвобождение конструкции доставки из везикулы, которая образовалась во время эндоцитоза конструкции доставки на апикальной поверхности эпителиальной клетки. Доставка и/или транспортировка в какое-то место во внутренней части клетки могут включать в себя удержание конструкции доставки в везикуле и/или высвобождение конструкции доставки из этой везикулы, таким образом, чтобы конструкция доставки могла контактировать с цитозолью эпителиальной клетки (например, конструкция может контактировать или не контактировать с цитозолью эпителиальной клетки во время трансцитоза из-за инкапсуляции в везикуле). Таким образом, носитель, содержащий усеченный вариант домена I Cholix, может высвобождаться из везикулы, например, те, что содержат аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 107 или ее функциональный фрагмент или производное.

[313] Конструкции доставки согласно настоящему раскрытию, содержащие носитель, содержащий аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 129 - SEQ ID NO: 133 или SEQ ID NO: 141 - SEQ ID NO: 145, могут обеспечить доставку и транспортировку гетерологичного (например, терапевтически или биологически активного) груза через эпителиальную клетку. Транспортировка через эпителиальную клетку (например, поляризованную эпителиальную клетку кишечника) может происходить посредством трансцитоза. Механизмом трансцитоза, используемым с помощью описанных в настоящей заявке конструкций доставки, является эндогенная система перемещения, содержащая множество разных рецепторов, с которыми взаимодействует конструкция доставки. Носитель конструкции доставки может содержать структурные элементы, которые обеспечивают взаимодействия этих рецепторов. Рецепторы, с которыми может взаимодействовать носитель, который раскрыт в настоящей заявке, включают в себя рибофилин 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и перлекан или любые их комбинации. Носитель, который описан в настоящей заявке, не может или может незначительно взаимодействовать с клатрином или GPR78 или их комбинацией.

[314] Использование эндогенной системы, содержащей эти рецепторы, может

иметь несколько преимуществ перед другими механизмами транспортировки. Использование эндогенной системы транспортировки может иметь следующие преимущества: (i) интактный слой эпителиальных клеток, такой как монослой или эпителий in vivo можно проходить без повреждения или нарушения клеток или структуры монослоя; (ii) можно обеспечить быструю и эффективную доставку и транспортировку; (iii) взаимодействие разных доменов или областей полученной из экзотоксина конструкции с конкретными рецепторами обеспечивает модуляцию этого взаимодействия способом, который обеспечивает специфическое нацеливание на определенные области или компартменты внутри клетки или у субъекта. Например, доставку и транспортировку (например, гетерологичного груза) во внутреннюю часть эпителиальной клетки можно обеспечить за счет использования определенных усеченных вариантов домена I экзотоксина, таких как те, что имеют аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 125 или ее функциональный фрагмент. Эпителиальная клетка может находиться в кишечнике субъекта (например, грызуна или человека). В разных вариантах осуществления доставку и транспортировку (например, гетерологичного груза) через эпителиальный слой посредством трансцитоза (например, за счет использования эндогенной системы трансцитоза) можно обеспечить за счет использования определенных усеченных вариантов или производных домена I экзотоксина, таких как те, что имеют аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 129 - SEQ ID NO: 133 или SEQ ID NO: 141 - SEQ ID NO: 145. Способность описанных в настоящей заявке конструкций доставки быстро и эффективно доставлять терапевтически активный и/или диагностический груз в эти места обеспечивает новые возможности лечения, предотвращения и/или диагностики различных заболеваний (например, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, заболеваний, связанных с дефицитом гормонов, ожирения и нарушения обмена веществ и рака).

[315] Конструкции доставки согласно настоящему раскрытию в дополнение к носителю, грузу и, необязательно, спейсеру могут дополнительно содержать один или более функциональных фрагментов. Функциональным фрагментом может быть обнаруживаемое средство, средство изменения аффинности (например, являющиеся объектом клик-химии функциональные группы, такие как азид), баркод (например, баркод нуклеиновой кислоты), проникающие в клетку средства или другие функциональные фрагменты, которые модулируют фармакокинетический (PK) и/или фармакодинамический (PD) профиль конструкции доставки. Конструкция доставки может содержать проникающее в клетку средство. Проникающим в клетку средством может быть пептид. Проникающее в клетку средство может включать в себя поликатионы, полиорганические кислоты, полимеры эндосомного высвобождения, поли(2-пропилакриловую кислоту), поли(2-этилакриловую кислоту), Tat пептид, последовательность Arg, узловой пептид, CysTAT, S19-TAT, R8 (SEQ ID NO: 73), pAntp, Pas-TAT, Pas-R8 (SEQ ID NO: 76), Pas-FHV, Pas-pAntP, F2R4 (SEQ ID NO: 79), B55, aurin,

IMT-P8, BR2, OMOTAG1, OMOTAG2, pVEC, SynB3, DPV1047, C105Y, транспотан, MTS, hLF, PFVYLI (SEQ ID NO: 93), маурокальцин, императоксин, гадрукалин, гемикальцин, опикальцин-1, опикальцин-2, мидкин (62-104), MCoTI-II или хлортоксин. Проникающее в клетку средство можно соединить с конструкцией доставки, которая описана в настоящей заявке, посредством N- или C-конца. Проникающее в клетку средство может обеспечить доступ в клетки множества типов. Проникающее в клетку средство может обеспечить дополнительную функциональность, например, для доставки терапевтического груза, после того как конструкция доставки прошла эпителиальный слой (например, эпителий субъекта).

[316] В способах и композициях согласно настоящему раскрытию представлены конструкции доставки, которые могут образовать мультимер. Мультимер, содержащий множество конструкций доставки, может быть образован в растворе. Мультимер может быть образован путем мультимеризации носителя и/или гетерологичного груза. Мультимером может быть гетеромер или гомомер. Гомомер может представлять собой гомодимер. Гомодимер может быть образован путем димеризации гетерологичного груза. Например, конструкция доставки, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, может образовать димер. В этом случае димеризация такой конструкции доставки может быть обусловлена димеризацией груза, например, IL-10 (например, SEQ ID NO: 217).

Сайт встраивания для Прикрепления гетерологичного груза

[317] способы и композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать конструкцию доставки, содержащую носитель, соединенный с грузом, таким как гетерологичный груз. Гетерологичный (например, биологически активный) груз можно присоединить к носителю (например, малой молекуле, полипептиду, аптамеру или нуклеиновой кислоте) любым способом, известным специалисту в данной области без ограничения. Гетерологичный груз можно ввести в любую часть носителя, которая не нарушает эндоцитоз и/или трансцитозную активность носителя.

[318] В настоящем раскрытии представлены конструкции доставки, которые содержат полипептидный носитель. Таким образом, гетерологичный груз можно прямо соединить с N-концом или C-концом такого полипептидного носителя (например, домена I или его усеченного варианта, например, SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125). Гетерологичный груз можно соединить с носителем посредством боковой цепи аминокислоты рецепторсвязывающего домена носителя. Гетерологичный груз можно соединить с носителем с помощью расщепляемого спейсера таким образом, чтобы расщепление расщепляемого спейсера (спейсеров) отделило гетерологичный груз от остальной части конструкции доставки. Гетерологичный груз также может представлять собой полипептид, который содержит короткий лидерный пептид, который остается присоединенным к полипептиду после расщепления расщепляемого спейсера. Например, гетерологичный груз может содержать короткий лидерный пептид более 1 аминокислоты, более 5 аминокислот, более 10 аминокислот, более 15 аминокислот, более 20

аминокислот, более 25 аминокислот, более 30 аминокислот, более 50 аминокислот или более 100 аминокислот. Биологически активный груз может содержать короткий лидерный пептид менее 100 аминокислот, менее 50 аминокислот, менее 30 аминокислот, менее 25 аминокислот, менее 20 аминокислот, менее 15 аминокислот, менее 10 аминокислот или менее 5 аминокислот. Биологически активный груз может содержать короткий лидерный пептид между 1-100 аминокислот, между 5-10 аминокислот, между 10-50 аминокислот или между 20-80 аминокислот.

[319] В рамках настоящего изобретения в настоящем раскрытии представлены способы и композиции, содержащие носитель, который получают из домена I экзотоксина, причем экзотоксином может быть Cholix или PE. В нативном Cholix (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2) и PE (например, SEQ ID NO: 135) петля домена Ib является несущественной для любой известной активности токсина, включая связывание клетки, транслокацию, удержание в ER или активность ADP-рибозилирование. Соответственно, домен Ib можно полностью удалить или модифицировать, чтобы он содержал гетерологичный груз, например, биологически активный груз. Таким образом, гетерологичный груз (например, биологически активный груз) можно вставить в носитель из домена Ib Cholix или PE. Гетерологичный груз (например, биологически активный груз), например, можно вставить в носитель, полученный из домена Ib Cholix, между несшитыми цистеинами в позициях 395 и 402. Это можно осуществить путем уменьшения дисульфидной связи между цистеинами, путем удаления одного или обоих цистеинов полностью из домена Ib, с помощью мутации одного или обоих цистеинов в другие остатки, например, серин, или с помощью других аналогичных методов. Альтернативно, биологически активный груз можно вставить в петлю домена Ib между цистеинами в позициях 395 и 402. В таких вариантах осуществления дисульфидную связь между цистеинами можно использовать для ограничения биологически активного грузового домена.

[320] Способы и композиции, описанные в настоящей заявке, могут содержать конструкции доставки, которые получают таким образом, чтобы гетерологичный груз экспрессировался вместе с носителем (и, необязательно, спейсером) в виде белка слияния (например, конструкции доставки). В таких случаях гетерологичный груз можно вставить в конструкцию доставки любым способом, известным специалисту в данной области, без ограничения. Например, аминокислоты, соответствующие гетерологичному грузу, можно непосредственно вставлять в рецепторсвязывающий домен, с делецией нативных аминокислотных последовательностей или без них. Альтернативно, гетерологичный груз может не экспрессироваться вместе с носителем (и, необязательно, спейсером) в виде белка слияния, гетерологичный груз можно соединить с носителем любым подходящим способом, известным специалисту в данной области, без ограничения, включая химию конъюгации пептидов и/или клик-химию.

Спейсеры

[321] Способы и композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать

конструкции доставки, содержащие носитель, соединенный с грузом (например, гетерологичным грузом), причем носитель способен доставлять гетерологичный груз в эпителиальную клетку и/или через нее in vitro (например, монослой эпителиальных клеток) или in vivo (например, эпителий кишечника субъекта). Такой носитель можно соединить с грузом любым способом, описанным в настоящей заявке. Носитель можно прямо или непрямо соединить с грузом. Носитель также можно ковалентно или не ковалентно соединить с грузом.

[322] В настоящем раскрытии представлены конструкции доставки, содержащие носитель, соединенный с гетерологичным грузом посредством спейсера. Спейсер может содержать любой фрагмент, приведенный в настоящей заявке. Спейсером может быть любая молекула, которая связывает носитель с грузом, и он может представлять собой олигомерные или полимерные спейсеры (например, полиэтиленгликоль и т.д.), другой низкомолекулярный спейсер (например, те, что получены из дикарбоновых кислот, таких как янтарная кислота, аспарагиновая кислота и т.д.) и аминокислот (включая короткие пептидные последовательности и так далее). Таким образом, «спейсер», который описан в настоящей заявке, обычно относится к химическому фрагменту, который можно присоединить или соединить с молекулой согласно настоящему раскрытию. Спейсер может находиться между первой молекулой и второй молекулой. Спейсер может соединять, прикреплять, связывать или присоединять первую молекулу (например, полипептид, малую молекулу, нуклеиновую кислоту и т.д.) ко второй молекуле (например, полипептиду, малой молекуле, нуклеиновой кислоте и т.д.). Спейсер может уменьшать стерическое несоответствие между первой молекулой и второй молекулой. Спейсером может быть аминокислотная последовательность, соединенная с С-концом пептида или полипептида. Аминокислотная последовательность спейсера, как раскрыто в настоящей заявке, может составлять между 1-100 аминокислотных остатков в длину. Спейсер может быть между 5-75 аминокислотных остатков в длину. Спейсер может быть между 5-50 аминокислотных остатков в длину. В некоторых случаях спейсер имеет между 5-25 аминокислотных остатков в длину. Носитель может содержать любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125, соединенных спейсером на С-конце (и спейсер можно дополнительно соединить с гетерологичным грузом посредством С-конца). Спейсером может быть аминокислотный спейсер. Спейсер может содержать любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 166 - SEQ ID NO: 213. Спейсер может содержать часть домена II, домена Ib или домена III экзотоксина или любые их комбинации. Например, конструкция доставки, которая описана в настоящей заявке, может содержать носитель, содержащий аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125, соединенную спейсером, причем спейсер содержит аминокислотные остатки 1-82 SEQ ID NO: 126.

[323] В настоящем раскрытии представлены конструкции доставки, которые содержат один или более спейсеров, которые дополнительно описаны в настоящей заявке. Спейсер может содержать аминокислотную последовательность. Спейсер может

содержать не более 82 аминокислотных остатков любой из SEQ ID NO: 126. Таким образом, спейсер может содержать первые 82 аминокислотных остатка аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 126. Аминокислотные остатки домена II Cholix могут быть смежными аминокислотными остатками (например, остатками 1-82 SEQ ID NO: 126).

[324] Другой спейсер, который можно использовать в комбинации с описанными в настоящей заявке способами и композициями, включает в себя те, что содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 207 - SEQ ID NO: 211. Спейсер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 210 или ее фрагмент или производное.

[325] Способы и композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать спейсер, который может содержать часть домена II, домена Ib и/или домена III экзотоксина. Например, носитель, содержащий аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125, можно дополнительно соединить (например, посредством С-конца) со спейсером, причем спейсер содержит от приблизительно 80 до приблизительно 90 аминокислотных остатков из любой из SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 128 и/или SEQ ID NO: 138 - SEQ ID NO: 140. Спейсер может содержать не более 85 аминокислотных остатков любой из SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 128 и/или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 139. Спейсер может содержать не более 82 аминокислотных остатков любой из SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 128 и/или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 139. Спейсер может содержать не более 80 аминокислотных остатков любой из SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 128 и/или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 139. Спейсер может содержать не более 50 аминокислотных остатков любой из SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 128 и/или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 139. Спейсер может содержать не более 25 аминокислотных остатков любой из SEQ ID NO: 126 - SEQ ID NO: 128 и/или SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 139.

[326] Спейсер может содержать не более 82 аминокислотных остатков любой из SEQ ID NO: 126. Спейсер может содержать первые 82 аминокислотных остатка аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 126. Аминокислотные остатки домена II Cholix могут быть смежными аминокислотными остатками (например, остатками 1-82 SEQ ID NO: 126).

[327] Спейсером согласно настоящему раскрытию может быть расщепляемый спейсер. Спейсером согласно настоящему раскрытию может быть нерасщепляемый спейсер.

Расщепляемые спейсеры

[328] Описанные в настоящем документе способы и композиции обеспечивают доставку гетерологичного груза (например, биологически или терапевтически активного груза) в место внутри эпителиальной клетки или через нее, причем гетерологичный груз можно соединить с носителем, образуя конструкцию доставки, которая описана в настоящей заявке. Такая конструкция доставки может дополнительно содержать спейсер,

который может непрямо соединять носитель с грузом (например, гетерологичным грузом). Спейсер, который описан в настоящей заявке, может представлять собой расщепляемый спейсер. Количество расщепляемых спейсеров, присутствующих в конструкции доставки, зависит по меньшей мере частично от места гетерологичного груза в отношении конструкции доставки и природы гетерологичного груза. Когда гетерологичный груз можно выделить из остальной части конструкции доставки с помощью расщепления одного спейсера, конструкции доставки могут содержать один расщепляемый спейсер. Кроме того, когда гетерологичным грузом является, например, димер или другой мультимер, каждая субъединица биологически активного груза может быть выделена из остальной части конструкции доставки и/или других субъединиц биологически активного груза путем расщепления расщепляемого спейсера.

[329] Расщепляемый спейсер можно расщеплять путем расщепления фермента, который находится на базолатеральной мембране эпителиальной клетки или около нее. Путем выбора расщепляемого спейсера, подлежащего расщеплению такими ферментами, биологически активный груз можно высвобождать из остальной части конструкции доставки после трансцитоза через слизистую мембрану и высвобождать из эпителиальной клетки в клеточный матрикс на базолатеральной стороне мембраны. Кроме того, можно использовать расщепляющие ферменты, которые находятся внутри эпителиальной клетки, таким образом, чтобы расщеплять расщепляемый спейсер перед высвобождением конструкции доставки из базолатеральной мембраны при условии, что расщепляющий фермент не расщепит конструкцию доставки перед попаданием конструкции доставки на путь миграции в поляризованной эпителиальной клетке, что приводит к высвобождению конструкции доставки и биологически активного груза из базолатеральной мембраны клетки.

[330] Носитель согласно настоящему раскрытию можно расщеплять ферментом. Фермент, который находится на базолатеральной мембране поляризованной эпителиальной клетки, можно выбирать, например, из Катепсина GI, Химотрипсина I, Эластазы I, Субтилизина AI, Субтилизина AII, Тромбина I или Урокиназы I. **В таблице 6** представлены эти ферменты вместе с аминокислотной последовательностью, которая распознается и расщепляется конкретной пептидазой.

ТАБЛИЦА 6 - Пептидазы, находящиеся Около Базолатеральных Слизистых Мембран или в поздних Аспектах пути трансцитоза

Пептидаза	**Расщепляемая Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO**
Катепсин GI	AAPF	SEQ ID NO: 166
Химотрипсин I	GGF	SEQ ID NO: 167
Эластаза I	AAPV	SEQ ID NO: 168
Субтилизин AI	GGL	SEQ ID NO: 169
Субтилизин AII	AAL	SEQ ID NO: 170

Тромбин I	FVR	SEQ ID NO: 171
Урокиназа I	VGR	SEQ ID NO: 172
Фурин	RQPR	SEQ ID NO: 173

[331] Расщепляемый спейсер может демонстрировать большую склонность к расщеплению, чем остальные части конструкции доставки. Как известно специалисту в данной области, многие пептидные и полипептидные последовательности можно расщеплять с помощью пептидаз и протеаз. Расщепляемый спейсер можно выбирать так, чтобы он предпочтительно расщеплялся относительно других аминокислотных последовательностей, присутствующих в конструкции доставки во время введения конструкции доставки. Носитель конструкции доставки может быть по существу (например, приблизительно на 99%, приблизительно 95%, приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80 или приблизительно 75%) интактным после доставки конструкции доставки в кровоток субъекта. Груз конструкции доставки может быть по существу (например, приблизительно на 99%, приблизительно 95%, приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80 или приблизительно 75%) интактным после доставки конструкции доставки в кровоток субъекта. Расщепляемый спейсер может быть по существу (например, приблизительно на 99%, приблизительно 95%, приблизительно 90%, приблизительно 85%, приблизительно 80 или приблизительно 75%) расщеплен после доставки конструкции доставки в кровоток субъекта.

[332] Для расщепляемого спейсера можно использовать расщепляющий фермент, находящийся в плазме субъекта. Для расщепляемого спейсера можно использовать любой расщепляющий фермент, который, как известно специалисту в данной области, находится в плазме субъекта. Способы использования таких ферментов для расщепления расщепляемых спейсеров являются менее предпочтительными, чем применение расщепляющих ферментов, находящихся около базолатеральной мембраны поляризованной эпителиальной клетки, поскольку считается, что более эффективное расщепление будет происходить около базолатеральной мембраны. Однако, если специалист определяет, что расщепление, опосредованное ферментом плазмы, является достаточно эффективным, чтобы обеспечить расщепление достаточной части конструкций доставки, чтобы избежать нежелательных эффектов; такие расщепляющие ферменты плазмы можно использовать для расщепления конструкций доставки. Соответственно, расщепляемый спейсер можно расщеплять ферментом, который выбирают из группы, состоящей из каспазы-1, каспазы-3, пропротеин конвертаза 1, пропротеин конвертазы 2, пропротеин конвертазы 4, пропротеин конвертазы 4 PACE 4, пролилолигопептидазы, фермента расщепления эндотелина, дипептидил-пептидазы IV, сигнальной пептидазы, неприлизина, ренина и эстеразы (см. Например, патент США № 6673574, полностью включенный в настоящее описание посредством ссылки). **В таблице 7** эти ферменты представлены вместе с аминокислотной последовательностью (последовательностями), распознаваемыми конкретными пептидазами. Пептидаза расщепляет пептид, содержащий

эти последовательности на N-концевой стороне аминокислоты, помеченной звездочкой.

ТАБЛИЦА 7 - Иллюстративные Пептидазы Плазмы

Пептидаза	**Расщепляемая Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO**
Каспаза-1	Tyr-Val-Ala-Asp-Xaa*	SEQ ID NO: 174
Каспаза-3	Asp-Xaa-Xaa-Asp-Xaa*	SEQ ID NO: 175
Пропротеин конвертаза 1	Arg-$(Xaa)_n$-Arg-Xaa*; n=0, 2, 4 или 6	SEQ ID NO: 176
Пропротеин конвертаза 2	Lys-$(Xaa)_n$-Arg-Xaa*; n=0, 2, 4 или 6	SEQ ID NO: 177
Пропротеин конвертаза 4	Glu-Arg-Thr-Lys-Arg-Xaa*	SEQ ID NO: 178
Пропротеин конвертаза 4 PACE 4	Arg-Val-Arg-Arg-Xaa*	SEQ ID NO: 179
	Decanoyl-Arg-Val-Arg-Arg-Xaa*	SEQ ID NO: 180
Пролилолигопептидаза Эндотелинрасщепляющий фермент в комбинации с дипептидил-пептидазой IV	Pro-Xaa*-Trp-Val-Pro-Xaa	SEQ ID NO: 181
Сигнальная пептидаза	Trp-Val*-Ala-Xaa	SEQ ID NO: 182
Неприлизин в комбинации с Дипептидил-пептидазой IV	Xaa-Phe*-Xaa-Xaa	SEQ ID NO: 183
	Xaa-Tyr*-Xaa-Xaa	SEQ ID NO: 184
	Xaa-Trp*-Xaa-Xaa	SEQ ID NO: 185
Ренин в комбинации с дипептидил-пептидазой IV	Asp-Arg-Tyr-Ile-Pro-Phe-His-Leu*-Leu-(Val, Ala или Pro)-Tyr-(Ser, Pro или Ala)	SEQ ID NO: 186

[333] Таким образом, расщепляемым спейсером может быть любой расщепляемый спейсер, который, как известно специалисту в данной области, расщепляется ферментом, который находится на базолатеральной мембране эпителиальной клетки. Расщепляемый

спейсер может содержать пептид. Расщепляемый спейсер может содержать нуклеиновую кислоту, такую как РНК или ДНК. Кроме того, расщепляемый спейсер может содержать углевод, такой как дисахарид или трисахарид.

[334] Альтернативно, расщепляемым спейсером может быть любой расщепляемый спейсер, который, как известно специалисту в данной области, расщепляется ферментом, который находится в плазме субъекта, которому вводят конструкцию доставки. Такой расщепляемый спейсер может содержать пептид. Такой расщепляемый спейсер может содержать нуклеиновую кислоту, такую как РНК или ДНК. Такой расщепляемый спейсер содержит углевод, такой как дисахарид или трисахарид .

[335] Расщепляемый спейсер можно выбирать или можно получить из иллюстративного списка, представленного в таблице **8**.

ТАБЛИЦА 8 - Аминокислотные последовательности иллюстративных Спейсеров

Пептидаза	**Спейсерная аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO**
Субтилизин A	SGGGGSGKAGSRGLT	SEQ ID NO: 187
Фурин	SGGGGSGGGGLRQPR	SEQ ID NO: 188
PC5a	SGGGGSGKKVERFRY	SEQ ID NO: 189
Тромбин	SGGGGSGGGGLMTPR	SEQ ID NO: 190
Про-матрипаза	SGGGGSGKAGSFSEG	SEQ ID NO: 191
Катепсин G	SGGGGSGKAGSAAPF	SEQ ID NO: 192
TEV	GGGGSGGGENLYFQS	SEQ ID NO: 193

[336] Кроме того, расщепляемый спейсер может представлять собой спейсер, который содержит аминокислотную последовательность, которая является известным субстратом для протеазы вируса гравировки табака (TEV). Соответственно, расщепляемый спейсер может содержать аминокислотную последовательность, приведенную, например, в GGGGSGGGENLYFQS (SEQ ID NO: 193)**.**

[337] Новые конструкции доставки согласно настоящему раскрытию могут содержать пептидную последовательность (и похожий домен), которая служит для ингибирования, создания помехи или блокирования способности биологически активного груза связываться с рецепторами на поверхности эпителиальных клеток. Соответственно, в зависимости от биологического груза, подлежащего доставке, пептидная последовательность (и похожий домен), которая служит для ингибирования, создания помехи или блокирования способности биологически активного груза связываться со своим рецептором на поверхности эпителиальных клеток, будет направляться конкретно к рецептору, с которым связывается биологически активный груз.

[338] Различные биологически активные грузы могут связываться с GM-1-ганглиозидами, находящимися на поверхностях клеток млекопитающих. Соответственно,

расщепляемый спейсер согласно настоящему раскрытию может содержать пептидную последовательность, которая служит для ингибирования, создания помехи или блокирования способности биологически активного груза связывать GM-1 на поверхности эпителиальных клеток. В патенте США № 8877161 представлено несколько пептидов, которые мешают связыванию лигандов с GM-1. **В таблице 9** представлены несколько примеров пептидных последовательностей, которые можно включать целиком или частично в расщепляемые спейсеры, подлежащие использованию для получения конструкций доставки согласно настоящему раскрытию.

ТАБЛИЦА 9 - Иллюстративные Связывающие GM-1 Пептиды

Пептидная последовательность	SEQ ID NO
VSWKTWFPNLAV	SEQ ID NO: 194
YSPFHKWFPSMH	SEQ ID NO: 195
IPQVWRDWFKLP	SEQ ID NO: 196
FPAWFTKLYPRT	SEQ ID NO: 197
QINTAKWWKTHF	SEQ ID NO: 198
DASKALRSSGMP	SEQ ID NO: 199
WKTWFP	SEQ ID NO: 200

[339] Расщепляемый спейсер, используемый для получения конструкций доставки согласно настоящему раскрытию, может содержать аминокислотную последовательность, например, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 и SEQ ID NO: 190 или ее варианты или фрагменты, которые представлены в таблице **10** ниже.

ТАБЛИЦА 10 - Иллюстративные Расщепляемые Спейсеры, Содержащие Связывающие GM-1 Пептиды

Иминокислотная последовательность Спейсера	SEQ ID NO
SGGGGWKTWFPRGLT	SEQ ID NO: 201
SGGGGWKTWFPRQPR	SEQ ID NO: 202
SGGGGWKTWFPRFRY	SEQ ID NO: 203
SGGGGWKTWFPMTPR	SEQ ID NO: 204
SGGGGWKTWFPFSEG	SEQ ID NO: 205
SGGGGWKTWFPAAPF	SEQ ID NO: 206

Нерасщепляемые спейсеры

[340] Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию может содержать носитель, соединенный с гетерологичным грузом (например, биологически активным грузом), причем груз можно выделить из носителя с помощью спейсера, состоящего из одной или нескольких аминокислот (например, до 25 аминокислот). Спейсером может быть пептидный спейсер или любая другая молекулярная структура, которую можно

использовать для соединения, чтобы связать первую и вторую молекулу. Обычно, спейсер не будет иметь специфической биологической активности, иной чем для соединения белков или для сохранения определенного минимального расстояния или другого пространственного взаимного расположения между ними. Однако составляющие аминокислоты спейсера можно выбирать так, чтобы влиять на какое-то свойство молекулы, такое как укладка, суммарный заряд или гидрофобность.

[341] Спейсер может быть способен образовывать ковалентные связи как с конструкцией доставки, так и с (например, биологически активным) грузом. Подходящие спейсеры хорошо известны специалистам в данной области и включают в себя, но без ограничения, углеродные спейсеры с прямой или разветвленной цепью, гетероцикличные углеродные спейсеры или пептидные спейсеры. Спейсер (спейсеры) можно соединить с составляющими аминокислотами конструкции доставки и/или биологически активным грузом посредством их боковых групп (например, посредством дисульфидной связи с цистеином). Спейсеры можно соединить с альфа углеродными амино и/или карбоксильными группами концевых аминокислот конструкции доставки и/или (например, биологически активным) грузом.

[342] Для образования нужного конъюгата можно использовать бифункциональный спейсер, имеющий одну функциональную группу, способную вступать в реакцию с группой на бактериальном носителе, и другую группу, вступающую в реакцию с биологически активным грузом. Альтернативно, дериватизация может включать в себя химическую обработку нацеливающего фрагмента. Известны методы образования, например, свободных сульфгидрильных групп на полипептидах, таких как антитела или фрагменты антител (см. Патент США № 4659839).

[343] Известно множество методов и спейсерных молекул для соединения различных соединений, включая хелаты радионуклидных металлов, токсины и лекарственные средства, с белками, такими как антитела. См. например, европейскую заявку на выдачу патента № 188256; патенты США №№ 4671958, 4659839, 4414148, 4699784; 4680338; 4569789; и 4589071; и Borlinghaus et al. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075.

[344] Груз (например, биологически активный груз), подлежащий доставке в некое место (например, место у субъекта, такого как человек), можно соединить с носителем с использованием одного или более нерасщепляемых пептидных спейсеров, содержащих, например, аминокислотную последовательность GTGGS (SEQ ID NO: 207), GGGGS (SEQ ID NO: 208), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 209), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210) или GGGGSGGG (SEQ ID NO: 211), причем носитель нацеливает указанный груз (например, биологически активный груз) на конкретные клетки, включая, но без ограничения, клетки иммунной системы, такие как макрофаги антиген-презентирующие клетки и дендритные клетки (например, при транспортировке груза через эпителиальную клетку). Обычно, нерасщепляемый спейсер может содержать одну или несколько $(GGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 212), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Нерасщепляемый спейсер

может содержать одну или несколько $(GS)_x$ (SEQ ID NO: 213), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Получение конструкций доставки

[345] конструкции доставки согласно настоящему раскрытию можно получить с использованием множества способов. Выбор способа получения может зависеть от молекулярной структуры конструкции доставки и/или ее компонентов (например, носителя, груза и/или спейсера). Таким образом, для некоторых конструкций доставки методы органического синтеза могут быть предпочтительными для получения такой конструкции доставки. Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию может представлять собой полипептид. Такие полипептиды можно получить, например, с использованием метода рекомбинантной ДНК. Обычно, он включает создание последовательности ДНК, которая кодирует конструкцию доставки, помещение ДНК в экспрессионную кассету под контролем конкретного промотора, экспрессию молекулы в хозяине, выделение экспрессированной молекулы и, при необходимости, укладку молекулы в активную конформационную форму.

[346] ДНК, кодирующую конструкции доставки, описанные в настоящей заявке, можно получать любым подходящим способом, включая, например, клонирование и рестрикцию соответствующих последовательностей или направление химического синтеза с помощью таких способов, как фосфотриэфирный метод Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99; фосфодиэфирный метод Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151; диэтилфосфорамитидный метод Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862); метод твердой подложки согласно патенту США № 4458066 и тому подобное.

[347] При химическом синтезе получают одноцепочечный олигонуклеотид. его можно преобразовать в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью или путем полимеризации с ДНК-полимеразой с использованием одной цепи в качестве матрицы. Специалисту будет понятно, что, хотя химический синтез ДНК ограничен последовательностями от приблизительно 100 оснований, более длинные последовательности можно получать путем лигирования более коротких последовательностей.

[348] Альтернативно, подпоследовательности можно клонировать, а соответствующие подпоследовательности расщеплять с использованием соответствующих ферментов рестрикции. Затем фрагменты можно лигировать для получения нужной последовательности ДНК. ДНК, кодирующую конструкции доставки согласно настоящему раскрытию, можно клонировать с использованием методов амплификации ДНК, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Таким образом, например, ген для биологически активного груза амплифицируют с помощью ПЦР с использованием смыслового праймера, содержащего сайт рестрикции, например, для NdeI, и антисмыслового праймера, содержащего сайт рестрикции для HindIII. Можно получить нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность биологически активного груза и имеющую концевые сайты рестрикции. Конструкцию доставки,

имеющую «комплементарные» сайты рестрикции, можно аналогичным образом клонировать, а затем лигировать с биологически активным грузом и/или со спейсером, соединенным с биологически активным грузом. При лигировании последовательностей нуклеиновой кислоты и вставке в вектор получают вектор, кодирующий биологически активный груз, соединенный с рецепторсвязывающим доменом бактериального носителя. В разных вариантах осуществления ДНК, кодирующую конструкции доставки согласно настоящему раскрытию, искусственно синтезируют, например, с помощью твердофазного синтеза ДНК.

[349] Способы получения, описанные в настоящей заявке, можно использовать для получения конструкций доставки согласно настоящему раскрытию или их (функциональных) вариантов. Например, «Cholix» (также упоминаемый в настоящей заявке как токсин Cholix или экзотоксин Cholix) может охватывать множество функциональных вариантов (например, функциональный род), причем функциональные варианты могут включать в себя один или более вариантов своей аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 1, как раскрыто в настоящей заявке. Таким образом, в настоящем раскрытии токсин Cholix, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, использован в качестве эталонной последовательности при упоминании Cholix. Однако, как описано в настоящей заявке, настоящее раскрытие не ограничено Cholix, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, но вместо этого охватывает все варианты Cholix, которые попадают в функциональный род Cholix. Например, вариантом экзотоксина Cholix с аминокислотной последовательностью SEQ ID NI: 1 может быть экзотоксин Cholix, аминокислотная последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 2, причем оба варианта способны выполнять одинаковые функции, например, трансцитоз через эпителиальную клетку, и взаимодействовать с одинаковыми рецепторами, такими как рибофилин 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и/или перлекан.

[350] Кроме того, способ получения полипептида до некоторой степени может затрагивать аминокислотную последовательность такого полипептида (например, из-за посттрансляционных модификаций). Например, первый носитель и второй носитель получают в одной и той же системе экспрессии (например, системе экспрессии бактерий, такой как E. coli, или системе экспрессии млекопитающих, такой как клетка CHO). В других случаях и как описано в настоящей заявке, первый носитель и второй носитель получают в разных системах экспрессии (например, системах экспрессии бактерий или млекопитающих). Бактериальные системы экспрессии включают в себя E. coli, а системы экспрессии млекопитающих включают в себя, например, клетки CHO. Получаемый бактериально полипептид может содержать N-кэп, причем N-кэп может содержать еще одну модификацию на N-конце полипептида. N-кэп может содержать N-концевой метиониновый остаток. Примеры полипептидов-носителей, полученных из домена I Cholix, которые можно получать бактериально и которые содержат такой N-концевой метионин, включают в себя те, что содержат аминокислотные последовательности SEQ ID

NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107 и SEQ ID NO: 135.

Груз

[351] В настоящем раскрытии представлены способы и композиции, которые обеспечивают быструю и эффективную доставку груза в эпителиальные клетки и/или через них (например, поляризованные эпителиальные клетки) in vitro (например, монослой клеток Caco-2) и in vivo (например, эпителий кишечника субъекта). Такую быструю и эффективную доставку можно обеспечить путем связывания груза (например, биологически активного груза) с носителем с образованием конструкции доставки. Такие конструкции доставки можно модифицировать для нацеливания на определенные места внутри эпителиальной клетки или для транспортировки груза через эпителиальную клетку, такую как интактная эпителиальная мембрана.

[352] В разных вариантах осуществления композиции и способы согласно настоящему раскрытию обеспечивают эффективную транспортировку и доставку различных грузовых молекул в разные места (например, органы, ткани или клетки) субъекта (например, грызуна или человека). Конструкции доставки согласно настоящему раскрытию могут обеспечить доставку в эпителиальные клетки и/или для быстрого трансцитоза (например, везикулярного трансцитоза) через слой эпителиальных клеток, такой как эпителий кишечника субъекта. Описанные в настоящем документе механизмы доставки обеспечивают транспортировку и доставку различных грузовых молекул. Описанные в настоящей заявке конструкции доставки можно соединить с по меньшей мере одной, по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере пятью или по меньшей мере 10 грузовыми молекулами. Грузом может быть гетерологичный груз, например, гетерологичный для носителя. Например, конструкция доставки, описанная в настоящей заявке, содержит носитель, полученный из домена I Cholix (например, те, что имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125), соединенный с гетерологичным грузом, причем гетерологичный груз представляет собой грузовую молекулу, полученную не из Cholix (например, не полученную или не содержащую фрагменты домена I, II, Ib и III токсина Cholix).

[353] Гетерологичным грузом может быть биологически активный груз. Биологически активный груз может содержать терапевтические и/или диагностические молекулы. Таким образом, конструкции доставки согласно настоящему раскрытию можно использовать для доставки биологически активного груза субъекту (например, грызуну или человеку). «Биологически активный груз» в рамках настоящего изобретения включает в себя, но без ограничения: макромолекулу, малую молекулу, пептид, полипептид, нуклеиновую кислоту, мРНК, микроРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловую молекулу, антитело, ДНК, плазмиду, вакцину, полимерные наночастицы или каталитически активный материал.

[354] Биологически активным грузом согласно настоящему раскрытию может быть макромолекула, которая может осуществлять нужную биологическую активность при

введении в кровоток субъекта. Например, биологически активный груз может обладать рецепторсвязывающей активностью, ферментативной активностью, информационной активностью (то есть выступать в качестве гормона, цитокина, нейротрансмиттера или другой сигнальной молекулы), люминисцентной или другой обнаруживаемой активностью или регуляторной активностью или любыми их комбинациями. Для некоторых диагностических целей биологически активный груз может быть конъюгирован или может сам представлять собой фармацевтически приемлемый гамма-излучающий фрагмент, включая, но без ограничения, индий и технеций, магнитные частицы, рентгеноконтрастные материалы, такие как воздух или барий и флуоресцентные соединения.

[355] Гетерологичный груз, который описан в настоящей заявке, может быть биологически активным грузом. Биологически активный груз, который является частью конструкции доставки, может оказывать свое действие в биологических компартментах субъекта, не являющихся кровью субъекта. Например, в разных вариантах осуществления биологически активный груз может оказывать свое действие в лимфатической системе. В других случаях биологически активный груз может оказывать свое действие в таком органе или ткане, как, например, печень, сердце, легкие, поджелудочная железа, почки, головной мозг, костный мозг субъекта и т.д. В связи с этим биологически активный груз может находиться или не находиться в крови, лимфе или другой биологической текучей среде в обнаруживаемых концентрациях, а также может все-таки накапливаться в достаточной концентрации в месте своего действия, чтобы оказывать биологическое действие.

[356] Биологически активным грузом может быть белок, который включает в себя более чем одну полипептидную субъединицу. Например, белок может представлять собой димер, тример или мультимер более высокого порядка. В разных вариантах осуществления две или более субъединицы белка можно соединить ковалентной связью, такой как, например, дисульфидная связь. Субъединицы белка могут удерживаться вместе за счет нековалентных взаимодействий. Специалист в данной области может стандартно идентифицировать такие белки и определять, правильно ли связаны субъединицы, с использованием, например, иммуноанализа.

[357] Биологически активный груз, подлежащий доставке в определенное место (например, у субъекта), можно выбирать, например, из цитокинов и рецепторов цитокинов, таких как Интерлейкин-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, фактор ингибирования лимфокинов, макрофагальный колониестимулирующий фактор, тромбоцитарный фактор роста, фактор стволовых клеток, фактор роста опухоли-β, фактор некроза опухоли, лимфотоксин, Fas, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерферон-α, интерферон-β, интерферон-γ, факторы роста и белковые гормоны, такие как эритропоэтин, ангиогенин, фактор роста

гепатоцитов, фактор роста фибробластов, фактор роста кератиноцитов, фактор роста нервов, фактор роста опухоли-α, тромбопоэтин, тиреостимулирующий фактор, тиреотропин-рилизинг-гормон, нейротрофин, фактор роста эпидермиса, VEGF, цилиарный нейротрофный фактор, LDL, соматомедин, инсулиновый фактор роста, инсулиноподобный фактор роста I и II, хемокины, такие как ENA-78, ELC, GRO-α, GRO-β, GRO-γ, HRG, LEF, IP-10, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MIP-1-α, MIP-1-β, MG, MDC, NT-3, NT-4, SCF, LIF, лептин, RANTES, лимфотактин, эотаксин-1, эотаксин-2, TARC, TECK, WAP-1, WAP-2, GCP-1, GCP-2; рецепторы α-хемокинов, например, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR7; и рецепторы β-хемокинов, например, CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7.

[358] В таблице **11** представлен иллюстративный, но неограничивающий список подходящего биологически активного груза, подлежащего использованию в конструкциях и способах согласно настоящему изобретению.

ТАБЛИЦА 11 - иллюстративные Биологически Активный груз

Груз	**RefSeq (NCBI/Uniprot)**
Интерлейкины	
IL-10	NP_000563
IL-19	NP_037503
IL-20	NP_061194
IL-22	NP_065386
IL-24	NP_006841
IL-26	NP_060872
Лиганды TNFSF	
Фактор некроза опухоли-α («TNF-α«)	NP_000585,2
лимфотоксин-α («LT-α«)	NP_ 000586,2
лимфотоксин-β («LT-β«)	NP_002332,1
лиганд CD30	NP_ 001235,1
лиганд CD40	NP_000065,1
лиганд CD70	NP_001243,1
лиганд OX40	NP_001284491,1
лиганд 41BB	NP_ 001552,2
лиганд Apo1 (или FasL или CD95L)	NP_ 000630,1
лиганд Apo2 (или TRAIL, AIM-1 или AGP-1)	NP_ 001177871,1
лиганд Apo3 (или TWEAK)	NP_003800,1
APRIL	NP_ 001185551,1
LIGHT	NP_ 003798,2

лиганд OPG (или лиганд RANK)	NP_ 003692,1
BlyS (или THANK)	NP_ 001139117,1
BCMA	NP_ 001183,2
TACI	NP_ 036584,1
TNFSFR	
TNFR1	NP_001056,1
TNFR2	NP_001057,1
лимфотоксин-βR	NP_001257916,1
CD40	NP_001241,1
CD95 (или FAS или APO-1)	NP_000034,1
OPG	NP_002537,3
RANK	NP_ 001257878,1
CD30	NP_001234,3
CD27	NP_001233,1
OX40 (или CD134)	NP_003318,1
41BB	NP_ 001552,2
NGFR	NP_ 002498,1
BCMA	NP_ 001183,2
TAC1	NP_ 036584,1
EDA2R	NP_001186616,1
TROY	NP_ 001191387,1
DR6	NP_ 055267,1
DR5 (или TRAILR2)	NP_ 003833,4
DR4	NP_ 003835,3
DR3	NP_ 001034753,1
HVEM	NP_ 001284534,1
LTβR	NP_ 001257916,1
GITR	NP_004186,1
DcR3	NP_003814
Fn14 (или TWEAKR)	NP_057723,1
BAFF	NP_443177,1
Белки, связанные с метаболизмом Глюкозы	
Пропротеин Глюкагон	NP_002045,1
Пептид Глюкагон	NP_002045,1 (aa 53-81)

Глюкагоноподобный пептид 1	NP_002045,1 (aa 98-128)
Глюкагоноподобный пептид 2	NP_002045,1 (aa 146-178)
Глицентин	P01275 (aa 21-89)
Полипептид, родственный глицентину	P01275 (aa 21-50)
Препротеин желудочного ингибиторного полипептида	NP_004114,1
Желудочный ингибиторный полипептид	NP_004114,1 (aa 52-93)
Дипептидил пептидаза 4	P27487
Глюкозный транспортер 4 типа	NP_001033,1
Препроглюкагон	AAA52567,1
Субстрат рецептора Инсулина 1	NP_005535,1
Инсулин	P01308
Аполипопротеин A-II	P02652
Семейство переносчиков растворенных веществ 2, Глюкозный транспортер 1 типа	P11166
Гликоген синтаза 1	P13807
Гликоген синтаза 2	P54840
Протеинтирозинфосфатаза нерецепторного типа 1	P18031
RAC-альфа серин/треонин-протеинкиназа	P31749
Гамма-рецептор, активируемый пролифератором пероксисом	P37231
Гексокиназа 3	P52790
Фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат 3-фосфатаза и белок двойной специфичности	P60484
киназа пируватдегидрогеназы 1	Q15118
Кальцийсвязывающий белок, содержащий биспиральный домен 1	Q9P1Z2
Max-подобный белок X	Q9UH92
фруктоза-бисфосфат алдолаза A	P04075
рецептор глюкагоноподобного пептида 1	P43220
рецептор глюкагоноподобного пептида 2	O95838
рецептор желудочного ингибиторного полипептида	P48546
рецептор инсулиноподобного фактора роста 1	P08069,1
рецептор инсулиноподобного фактора роста 2	P11717,3
Рецептор Инсулина	P06213

GLP-1 агонист-эксенатид	DB01276
GLP-1 агонист-лираглутид	DB06655
Связанные с Гормоном роста Белки	
Соматотропин	P01241
Синтетический Гормон роста человека	AAA72260,1
Неполный Синтетический Гормон роста человека	CAA01435
Неполный Синтетический Гормон роста человека	CAA00380
Гормон роста человека 2	P01242
соматолиберин	P01286,1
Регулирующий аппетит Гормон	Q9UBU3
Лептин	P41159
Белки Рецепторов Гормона роста	
Рецептор Гормона роста	P10912
Рецептор Гормона роста-Рилизинг Гормона	Q02643
Рецептор стимулятора секреции Гормона роста	Q92847
Рецептор Гормона роста-Рилизинг Гормона форма a	P78470
Рецептор Гормона роста	E9PCN7

[359] Биологически активным грузом, который описан в настоящей заявке, может быть гормон. Таким гормоном может быть гормон роста. Гормоном может быть гормон роста человека, имеющий, например, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 214.

[360] Биологически активным грузом может быть молекула, которая влияет и/или взаимодействует с обменом веществ субъекта. Таким образом, биологически активным грузом, который описан в настоящей заявке, может быть лекарственное средство, которое можно использовать для предотвращения, лечения и/или диагностики нарушения или состояния обмена веществ. Таким образом, биологически активным грузом, который описан в настоящей заявке, может быть глюкагоноподобный пептид (GLP). GLP может быть GLP-1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215. Гормоном, который можно использовать в комбинации со способами и композициями, описанными в настоящей заявке, может быть инсулин (с удаленным из зрелого белка элементом с-пептидом) или его производное. Инсулиновый пептид может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 216.

[361] Биологически активным грузом может быть интерлейкин. Конкретно, интерлейкины, которые можно использовать со способами и композициями, описанными в настоящей заявке, могут включать в себя IL-10 и IL-22, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 и SEQ ID NO: 218, соответственно.

[362] Биологически активный груз, раскрытой в настоящей заявке, может

модулировать пространственную ориентацию конструкции доставки. Например, грузовая молекула может индуцировать мультимеризацию двух или более конструкций доставки. Такие мультимеры могут быть гомомерами или гетеромерами. Мультимер может быть гомодимером. Например, конструкция доставки, содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217, может образовать димер. Такую димеризацию можно индуцировать с помощью IL-10 (так как IL-10 может образовать природный димер и, таким образом, способствовать димеризации конструкции доставки, содержащей IL-10 в качестве груза).

[363] Биологически активный груз может также содержать токсин, такой как эндотоксины, энтеротоксины или экзотоксины. Например, биологически активным грузом может быть полипептид ExtB (который будет образовывать природный пентамер), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 219.

[364] Другие примеры биологически активного груза, который можно доставлять согласно настоящему раскрытию, включают в себя, но без ограничения, противоопухолевые соединения, такие как нитрозомочевины, например кармустин, ломустин, семустин, стрепзотоцин; метилгидразины, например прокарбазин, дакарбазин; стероидные гормоны, например глюкокортикоиды, эстрогены, прогестины, андрогены, тетрагидродезоксикарикостерон; иммуноактивные соединения, такие как иммунодепрессанты, например пириметамин, триметоптерин, пеницилламин, циклоспорин, азатиоприн; и иммуностимуляторы, например левамизол, диэтилдитиокарбамат, энкефалины, эндорфины; противомикробные соединения, такие как антибиотики, например, β-лактам, пенициллин, цефалоспорины, карбапенимы и монобактамы, ингибиторы β-лактамаз, аминогликозиды, макролиды, тетрациклины, спектиномицин; противомалярийные средства, амебициды; антипротазоалы; противогрибковые средства, например амфотерицин β, противовирусные средства, например ацикловир, идоксуридин, рибавирин, трифлуридин, видарбин, ганцикловир; паразитициды; противогальминтные средства; радиофармацевтические средства; желудочно-кишечные препараты; гематологические соединения; иммуноглобулины; белки свертывания крови, например антигемофильный фактор, комплекс фактора IX; антикоагулянты, например дикумарол, гепарин Na; ингибиторы фибролизина, например транексамовая кислота; сердечно-сосудистые препараты; периферические антиадренергические препараты; антигипертензивные препараты центрального действия, например метилдопа, метилдопа HCl; антигипертензивные прямые вазодилататоры, например диазоксид, гидралазин HCl; препараты, влияющие на ренин-ангиотензиновую систему; периферические вазодилататоры, например фентоламин; антиангинальные препараты; сердечные гликозиды; инодилататоры, например аминон, милринон, эноксимон, феноксимон, имазодан, сульмазол; антиаритмические средства; блокаторы кальциевого канала; препараты, влияющие на липиды крови, например ранитидин, бозентан, резулин; респираторные препараты; симпатомиметические препараты, например, альбутерол, мезилат битолтерола, добутамин HCl, дофамин HCl, эфедрин So,

эпинефрин, фенфлурамин HCl, изопротеренол HCl, метоксамин HCl, норэпинефрин битартрат, фенилэфрин HCl, ритодрин HCl; холиномиметические препараты, например ацетилхолин Cl; антихолинэстеразы, например, эдрофоний Cl; реактиваторы холинэстеразы; адреноблокаторы, например ацебутолол HCl, атенолол, эсмолол HCl, лабеталол HCl, метопролол, надолол, мезилат фентоламина, пропанолол HCl; антимускариновые лекарственные средства, например анизотропина метилбромид, атропин SO_4, клинидий Br, гликопирролат, ипратропиум Br, скополамин HBr; нервно-мышечные блокаторы; деполяризующие лекарственные средства, например безилат атракурия, гексафлурония Br, метокурина йодид, сукцинилхолин Cl, тубокурарин Cl, векуроний Br; миорелаксанты центрального действия, например баклофен; нейротрансмиттеры и нейротрансмиттерные средства, например, ацетилхолин, аденозин, аденозинтрифосфат; аминокислотные нейротрансмиттеры, например, возбуждающие аминокислоты, GABA, глицин; нейротрансмиттеры биогенного амина, например дофамин, эпинефрин, гистамин, норэпинефрин, октопамин, серотонин, тирамин; нейропептиды, оксид азота, токсины K+ каналов; противопаркинсонические препараты, например амальтидин HCl, мезилат бензтропина, карбидопа; диуретические препараты, например дихлорфенамид, метазоламид, бендрофлуметиазид, политиазид; лекарства от мигрени, например мезилат карбопроста трометамина, малеат метисергида.

[365] Другие примеры биологически активного груза, который можно доставлять согласно настоящему раскрытию, включают в себя, но без ограничения, гормоны, такие как гормоны гипофиза, например хорионический гонадотропин, косинтропин, менотропины, соматотропин, иортикотропин, протирелин, тиреотропин, вазопрессин, липрессин; гормоны надпочечников, например дипропионат беклометазона, бетаметазон, дексарнетазон, триамцинолон; гормоны поджелудочной железы, например глюкагон, инсулин; паратиреоидный гормон, например дигидрохистерин; гормоны щитовидной железы, например динатрий этидроната кальцитонина, левотироксин Na, лиотиронин Na, лиотрикс, тиреоглобулин, терипаратида ацетат; антитиреоидные препараты; эстрогенные гормоны; прогестины и антагонисты; гормональные контрацептивы; гормоны яичек; желудочно-кишечные гормоны, например холецистокинин, энтерогликан, галанин, полипептид, ингибирующий желудочно-кишечный тракт, эпидермальный фактор роста-урогастрон, желудочный ингибирующий полипептид, высвобождающий гастрин пептид, гастрины, пентагастрин, тетрагастрин, мотилин, пептид YY, секретин, вазоактивный пептид кишечника или синкалид.

[366] Другие примеры биологически активного груза, который можно доставлять согласно настоящему раскрытию, включают в себя, но без ограничения, ферменты, такие как гиалуронидаза, стрептокиназа, тканевый активатор плазминогена, урокиназа, PGE-аденозиндезаминаза; внутривенные анестетики, такие как дроперидол, этомидат, фетанилцитрат/дроперидол, гексобарбитал, кетамин HCl, метогекситал Na, тиамилал Na, тиопентал Na; противоэпилептические средства, например карбамазепин, клоназепам, дивалпроекс Na, этосуксимид, мефенилоин, параметадион, фенилоин, примидон. В

различных вариантах осуществления биологически активный груз представляет собой фермент, выбираемый из гиалуронидазы, стрептокиназы, тканевого активатора плазминогена, урокиназы, PGE-аденозиндезаминазы.

[367] Биологически активный груз, который описан в настоящей заявке, также может включать в себя терапевтическое и/или диагностическое антитело, фрагмент антитела, диатела, минитела или одноцепочечный вариабельный фрагмент (например, scFv) или их комбинации. Например, биологически активным грузом, который описан в настоящей заявке, может быть средство против фактора некроза опухоли альфа (против TNFa). Средством против TNFa является антитело против TNFa или его функциональный фрагмент. Антителом против TNFa может быть адалимумаб (Abbvie HUMIRA®, Drug Bank DB 00051) или инфликсимаб (Centocor REMICADE®, Drug Bank DB 00065) или функциональный фрагмент (например, связывающий их фрагменты).

[368] Другие примеры биологически активного груза, который можно доставлять согласно настоящему раскрытию, включают в себя, но без ограничения, химиотерапевтические средства, такие как химиотерапевтические или противоопухолевые средства, которые являются эффективными против различных типов рака человека, включая лейкемию, лимфомы, карциномы, саркомы, миеломы и так далее, такие как, например, доксорубицин, митомицин, цисплатин, даунорубицин, блеомицин, актиномицин D и неокарциностатин.

[369] Другие примеры биологически активного груза, который можно доставлять согласно настоящему раскрытию, включают в себя ингибиторы регуляторных Т клеток (Tregs), таких как Treg, которые экспрессируют CD4, CD25 и Foxp3, и Treg, такие как Tr1, Th3, CD8+CD28-, Qa-1 ограниченные Т клетки и IL-17 Treg клетки. Такие ингибиторы Treg широко изучены и описаны в данной области (см. Например, Casares et al, Journal of Immunology, 185(9): 5150-5159, 2010 и процитированные там ссылки).

[370] В таблице 12 представлены иллюстративные аминокислотные последовательности различных гетерологичных грузов, которые можно использовать в комбинации с раскрытыми в настоящей заявке способами и композициями. Например, любую из гетерологичных грузовых молекул, показанных в таблице **12** ниже, можно комбинировать с любым носителем, раскрытым в настоящей заявке, например, с теми носителями, которые перечислены в таблице **2** и/или таблице **3** выше.

ТАБЛИЦА 12 - Иллюстративные Аминокислотные Последовательности Гетерологичного груза

SEQ ID NO	**Последовательность**
SEQ ID NO: 214	FPTIPLSRLFДHKMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNP QTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFA NSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKF DTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF
SEQ ID NO:	MKIILWLCVFGLFLATLFPISWQMPVESGLSSEDSASSESFASKIKRHG

215	EGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPSG
SEQ ID NO: 216	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGE RGFFYTPKTRREAEDLQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIV EQCCTSICSLYQLENYCN
SEQ ID NO: 217	MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDA FSRVKTFFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKГYLGCQALSEMIQFYLEEV MPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQ VKNAFNKLQEKГIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN
SEQ ID NO: 218	MAALQKSVSSFLMGTLATSCLLLLALLVQGGAAAPISSHCRLDKSNF QQPYITNRTFMLAKEASLADNNTDVRLIGEKLFHGVSMSERCYLMKQ VLNFTLEEVLFPQSDRFQPYMQEVVPFLARLSNRLSTCHIEGDDLHIQ RNVQKLKDTVKKLGESGEIKAIGELDLLFMSLRNACI
SEQ ID NO: 219	MKKNIAFLLASMFVFSIATNAYASTQSNKKDLCEHYRQIAKESCKKГF LGVRDGTAGACFGAQIMVAAKГC
SEQ ID NO: 220	MRSSKNVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNTVKLK VTKГGPLPFAWDILSPQFQYGSKVYVKHPADIPDYKKLSFPEGFKWER VMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGCFIYKVKФИГVNFPSDGPVMQKKT MGWEASTERLYPRDGVLKГEIHKALKLKDGGHYLVEFKSIYMAKKP VQLPGYYYVDSKLDITSHNEDYTIVEQYERTEGRHHLFL

[371] Грузовая молекула согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220, по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и/или любую их комбинацию. Грузовая молекула согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220, по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и/или любую их комбинацию. Грузовая молекула согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220, по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом и/или любую их комбинацию. Грузовая молекула согласно настоящему раскрытию может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220, по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом

и/или любую их комбинацию. Грузовая молекула согласно настоящему раскрытию может содержать любую из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 214 - SEQ ID NO: 220, ее функциональный фрагмент и/или любую их комбинацию.

[372] Обычно, груз, описанный и раскрытый в настоящей заявке, может удерживаться в месте, на которое был нацелен, с использованием композиций, описанных в настоящей заявке. Удержание может обеспечивать вызов грузовой молекулой опеделенного ответа или биологического действия (например, терапевтического эффекта). Доставка молекулы (например, гетерологичного груза) в некое место (например, внутриклеточный компартмент или супрануклеарную область) может относится к удержанию молекулы в этом месте. Удержание молекулы в определенной внутриклеточной или внеклеточной области или компартменте может длиться определенное время, например, по меньшей мере 2 минуты, по меньшей мере 5 минут, по меньшей мере 10 минут, по меньшей мере 15 минут, по меньшей мере 30 минут или по меньшей мере 60 минут. Удержание молекулы может зависеть от различных факторов, таких как место, где удерживается молекула, и/или типы молекулярных взаимодействий, которые происходят между молекулой (например, носителем, конструкцией доставки и/или гетерологичным грузом). Например, доставка гетерологичного груза в базолатеральный компартмент посредством трансцитоза через поляризованную эпителиальную клетку может включать в себя удержание гетерологичного груза в базолатеральном месте в течение времени, достаточного для достижения определенного эффекта, например, терапевтического эффекта в случае терапевтического и/или биологически активного груза. Конструкция доставки может быть выполнена с возможностью высвобождения груза в конкретном месте, например, за счет использования зависимого от pH и/или зависимого от фермента спейсера. При высвобождении груза из носителя грузовая молекула может вызывать определенный эффект и/или ответ. Например, в случае биологически и/или терапевтически активных грузов такие грузы могут вызывать их терапевтические эффекты in vitro или in vivo при высвобождении из носителя. Груз также может быть способен вызывать ответ, когда еще связан с носителем. Это может зависеть от груза и/или конструкции доставки.

[373] Гетерологичным грузом может быть обнаруживаемое средство, такое как флуоресцентная молекула или радиоактивный фрагмент. Обнаруживаемое средство, которое описано в настоящей заявке, можно использовать для обнаружения молекулы, с которой соединено обнаруживаемое средство, в различных местах, например, внутри субъекта или внутри клетки. Обнаруживаемое средство также может иметь дополнительные признаки и функции, такие как терапевтические или другие биологические свойства. Например, радионуклид, соединенный с носителем, который описан в настоящей заявке, может обеспечивать обнаружение носителя, но также может иметь терапевтические свойства, например, как терапевтический радионуклид. Обычно, носитель можно конъюгировать, связывать или сливать с обнаруживаемым средством, таким как флуорофор, краситель ближнего инфракрасного диапазона, контрастное

средство, наночастица, металлсодержащая наночастица, хелат металла, рентгеноконтрастное средство, средство PET, металл, радиоизотоп, краситель, хелатообразователь для радионуклидов или другой подходящий материал, который можно использовать при визуализации.

[374] Конструкция доставки может содержать приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 обнаруживаемых средств. Неограничивающие примеры радиоизотопов, которые можно использовать в качестве обнаруживаемого средства, включают в себя альфа излучатели, бета излучатели, позитронные излучатели и гамма излучатели. Металл или радиоизотоп можно выбрать из группы, состоящей из актиния, америция, висмута, кадмия, цезия, кобальта, европия, гадолиния, иридия, свинца, лютеция, марганца, палладия, полония, радия, рутения, самария, стронция, технеция, таллия и иттрия. Металлом может быть актиний, висмут, свинец, радий, стронций, самарий или иттрий. Радиоизотопом может быть актиний-225 или свинец-212. Красители ближнего инфракрасного диапазона, которые можно использовать в комбинации с описанными в настоящей заявке химерными связывающими средствами, не могут быть легко подавлены биологическими тканями и текучими средами. Флуорофором может быть флуоресцентное средство, излучающее электромагнитное излучение при длине волны между 650 нМ и 4000 нМ, такое излучение используется для обнаружения такого средства. Неограничивающие примеры флуоресцентных красителей, которые можно использовать в качестве конъюгированной молекул в настоящем раскрытии, включают в себя DyLight-680, DyLight-750, VivoTag-750, DyLight-800, IRDye-800, VivoTag-680, Cy5.5 или индоцианин зеленый (ICG). Красители ближнего инфракрасного диапазона могут включать в себя цианиновые красители (например, Cy7, Cy5.5 и Cy5). Дополнительные неограничивающие примеры флуоресцентных красителей для применения в качестве конъюгированной молекулы в настоящем раскрытии могут включать в себя аркадин оранжевый или желтый, Alexa Fluors (например, Alexa Fluor 790, 750, 700, 680, 660 и 647) и любые его производные, 7-актиномицин D, 8-анилинонафтален-1-сульфоновая кислота, краситель ATTO и любые его производные, краситель аурамин-родамин и любые его производные, бенсантрон, биман, 9-10-бис(фенилэтинил)антрацен, 5,12 - бис(фенилэтинил)наттацен, бисбензимид, брэйнбоу, кальцеин, карбодифлуоресцеин и любые его производные, 1-хлор-9,10-бис(фенилэтинил)антрацен и любые его производные, DAPI, DiOC6, DyLight Fluors и любые его производные, эпикокконон, этидий бромид, FlAsH-EDT2, краситель Fluo и любые его производные, FluoProbe и любые его производные, Флуоресцеин и любые его производные, Fura и любые его производные, GelGreen и любые его производные, GelRed и любые его производные, флуоресцентные белки и любые его производные, m изоформы белков и любое производное, такое как mCherry, краситель hetamethine и любые его производные, hoeschst краситель, иминокумарин, индийский желтый, indo-1 и любые его производные, лаурдан, люцифер желтый и любые его производные, люциферин и любые его производные, люцифераза и любые ее производные, меркоцианин и любые его производные, нильские

красители и любые их производные, перилен, флоксин, фикокраситель и любые его производные, йодид пропия, пиранин, родамин и любые его производные, рибогрин, RoGFP, рубрен, стильбен и любые его производные, сульфородамин и любые его производные, SYBR и любые его производные, synapto-pHluorin, тетрафенил бутадиен, тетранатрия трис, техасский красный, титановый желтый, TSQ, умбеллиферон, виолантрон, желтый флуоресцентный белок и YOYO-1. Другие подходящие флуоресцентные красители могут включать в себя, но без ограничения, флуоресцеин и флуоресцеиновые красители (например, флуоресцеин изотиоцианин или FITC, нафтофлуоресцеин, 4′, 5′-дихлор-2′,7′-диметоксифлуоресцеин, 6-карбоксифлуоресцеин или FAM и т.д.), карбоцианин, мероцианин, стириловые красители, оксоноловые красители, фикоэритрин, эритрозин, эозин, родаминовые красители (например, карбокситетраметил-родамин или TAMRA, карбоксиродамин 6G, карбокси-X-родамин (ROX), лиссамин родамин B, родамин 6G, родамин зеленый, родамин красный, тетраметилродамин (TMR) и т.д.), coumarin и кумариновые красители (например, метоксикумарин, диалкиламинокумарин, гидроксикумарин, аминометилкумарин (AMCA) и т.д.), красители илиegon Green (например, илиegon Green 488, илиegon Green 500, илиegon Green 514 и т.д.), техасский красный, техасский красный-X, SPECTRUM RED, SPECTRUM GREEN, цианиновые красители (например, CY-3, Cy-5, CY-3,5, CY-5,5 и т.д.), красители ALEXA FLUOR (например, ALEXA FLUOR 350, ALEXA FLUOR 488, ALEXA FLUOR 532, ALEXA FLUOR 546, ALEXA FLUOR 568, ALEXA FLUOR 594, ALEXA FLUOR 633, ALEXA FLUOR 660, ALEXA FLUOR 680 и т.д.), красители BODIPY (например, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, BODIPY TR, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665 и т.д.), IRDyes (например, IRD40, IRD 700, IRD 800 и т.д.) и тому подобное. Дополнительные подходящие обнаруживаемые средства описаны в PCT/US14/56177. Неограничивающие примеры радиоизотопов включают в себя альфа излучатели, бета излучатели, позитронные излучатели и гамма излучатели. Металл или радиоизотоп можно выбрать из группы, состоящей из актиния, америция, висмута, кадмия, цезия, кобальта, европия, гадолиния, иридия, свинца, лютеция, марганца, палладия, полония, радия, рутения, самария, стронция, технеция, таллия и иттрия. Металлом может быть актиний, висмут, свинец, радий, стронций, самарий или иттрий. Радиоизотопом может быть актиний-225 или свинец-212. Кроме того, для диагностики и/или терапии можно использовать следующие радионуклиды: углерод (например, ^{11}C или ^{14}C), азот (например, ^{13}N), фтор (например, ^{18}F), галлий (например, ^{67}Ga или ^{68}Ga), медь (например, ^{64}Cu или ^{67}Cu), цирконий (например, ^{89}Zr), лютеций (например, ^{177}Lu).

[375] Конструкция доставки, которая раскрыта в настоящей заявке, может быть конъюгирована, соединена или слита с радиосенсибилизатором или фотосенсибилизатором. Примеры радиосенсибилизаторов могут включать в себя, но без ограничения: ABT-263, ABT-199, WEHI-539, паклитаксел, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, гемцитабин, этанидазол, мизонидазол, тирапазамин и производные

оснований нуклеиновых кислот (например, галогенированные пурины или пиримидины, такие как 5-фтордезоксиуридин). Примеры фотосенсибилизаторов могут включать в себя, но без ограничения: флуоресцентные молекулы или шарики, которые выделяют тепло при освещении, наночастицы, порфирины и производные порфиринов (например, хлорины, бактериохлорины, изобактериохлорины, фталоцианины и нафталоцианины), металлопорфирины, металлофталоцианины, ангелицины, халькогенапирриловые красители, хлорофиллы, кумарины, флавины и родственные соединения, такие как аллоксазин и рибофлавин, фуллерены, феофорбиды, пирофеофорбиды, цианины (например, мероцианин 540), феофитины, сапфирины, тексафирины, пурпурины, порфицены, фенотиазины, производные метилена синего, нафталимиды, фенетиленфенизиды, производные нильского голубого, хиноны, периленхиноны (например, гиперицины, гипокреллины и церкоспорины), псоралены, хиноны, ретиноиды, родамины, тиофены, вердины, ксантеновые красители (например, эозины, эритрозины, бенгалы розы), димерные и олигомерные формы порфиринов и пролекарства, такие как 5-аминолевулиновая кислота. Преимущественно этот подход может обеспечить высокоспецифичное нацеливание на больные клетки (например, раковые клетки) с одновременным использованием как терапевтического средства (например, лекарственного средства), так и электромагнитной энергии (например, излучения или света). Белки согласно настоящему изобретению могут быть конъюгированы, соединены, слиты со средством или ковалентно или нековалентно связаны со средством, например, напрямую или посредством спейсера.

[376] Радионуклид можно соединить с носителем или конструкцией доставки, которая описана в настоящей заявке, с использованием хелатообразователя. Иллюстративные фрагменты хелатообразователя могут содержать 2,2′,2″-(3-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил)-1-оксо-5,8,11,14,17,20,23-гептаокса-2-азапентакозан-25-ил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(3-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил)-1-оксо-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-ундекаокса-2-азагептатриаконтан-37-ил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′-(7-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил)-1-оксо-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-ундекаокса-2-азагептатриаконтан-37-ил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-1,4-диил)ацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(3-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил)-3,7-диоксо-11,14,17,20,23,26,29-гептаокса-2,8-диазагентриаконтан-31-ил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(3-(4-(3-(1-(4-(1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил)-3,7-диоксо-11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41-ундекаокса-2,8-диазатритетраконтан-43-ил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(3-(4-(3-(25,28-диоксо-28-((6-(6-(пиридин-2-ил)-1,2,4,5-тетразин-3-ил)пиридин-3-ил)амино)-3,6,9,12,15,18,21-гептаокса-24-азаоктакосил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(3-(4-(3-(37,40-диоксо-40-((6-(6-(пиридин-2-ил)-1,2,4,5-тетразин-3-ил)пиридин-3-ил)амино)-

3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-ундекаокса-36-азатетраконтил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(3-(4-(1-(4-(6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенил)-3-оксо-6,9,12,15,18,21,24-гептаокса-2-азагептакозан-27-амидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(2-(4-(1-(4-(6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-ил)фенокси)-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-ундекаоксагексатриаконтан-36-амидо)бензил)-1,4,7-триазонан-1,4,7-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(3-(4-(3-(5-амино-6-((4-(6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)амино)-6-оксогексил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; 2,2′-(7-(4-(3-(5-амино-6-((4-6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)амино)-6-оксогексил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-1,4-диил)ацетоуксусная кислота; 2,2′,2″-(3-(4-(3-(5-амино-6-((5-амино-6-((4-(6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота; и 2,2′,2″-(3-(4-(3-(5-амино-6-((5-амино-6-((5-амино-6-((4-(6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-ил)бензил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)амино)-6-оксогексил)тиоуреидо)бензил)-1,4,7-триазонан-2,5,8-триил)ацетилацетоуксусная кислота.

Применение

[377] В настоящем раскрытии представлены способы и композиции для транспортировки и/или доставки грузовой молекулы в определенное место (места) внутри клетки (например, супрануклеарное место) или через клетку (например, эпителиальную клетку), либо in vitro, либо in vivo (например, у грызуна или человека). Такой груз можно направить в какое-то место (ряд мест) путем его связывания с молекулой-переносчиком. Такая молекула-переносчик может взаимодействовать с уникальными рецепторами как на клеточной поверхности, так и внутри клетки для нацеленной доставки груза. В настоящей заявке описаны различные такой носитель, грузы и способы их использования.

[378] В настоящей заявке представлены конструкции доставки, которые можно использовать для доставки груза в какое-то место внутри клетки (например, эпителиальной клетки) или через клетку (например, эпителиальную клетку). Такие носители могут представлять собой малую молекулу, полипептид, аптамер, антитело, нуклеиновую кислоту, фрагмент любого из перечисленного выше или комбинацию любых из перечисленных выше. Конструкции доставки, описанные в настоящей заявке, можно использовать для различных вариантов применения, включая, но без ограничения, терапевтические, профилактические и/или диагностические варианты применения. Такие терапевтические, профилактические и/или диагностические варианты применения можно обеспечить, если, например, терапевтически активные грузовые молекулы соединены с носителями, описанными в настоящей заявке, которые обеспечивают нацеленную доставку в различные места (например, у субъекта, такого как человек).

Фармацевтические Композиции и Способы Доставки

[379] Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию относятся к композициям для введения субъекту-человеку. Фармацевтические композиции содержат

не существующие в природе конструкции доставки, приведенные в настоящей заявке, отдельно или в комбинации. Фармацевтические композиции могут содержать дополнительный молекулы, способные изменять характеристики не существующих в природе конструкций доставки, например, стабилизируя, модулируя и/или активируя их функцию. Композиция может, например, быть в твердой или жидкой форме и, среди прочего, может быть в форме порошка (порошков), таблетки (таблеток), раствора (растворов) или аэрозоля (аэрозолей). Кроме того, фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может необязательно содержать фармацевтически приемлемый носитель. «Фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу и любому из стандартных фармацевтических носителей, средств доставки, буферов и вспомогательных веществ, таких как солевой раствор с фосфатным буфером, 5% водный раствор декстрозы и эмульсии, такие как эмульсия масло/вода или вода/масло, и смачивающие средства и/или адъюванты различных типов.

[380] Фармацевтические композиции обычно составляют, соответственно, для немедленного применения, предназначенного для конструкции доставки. Например, если конструкция доставки не предназначена для немедленного введения, конструкцию доставки можно составить в композиции, подходящей для хранения. Одна такая композиция представляет собой лиофилизированный препарат конструкции доставки вместе с подходящим стабилизатором. Альтернативно, композицию конструкции доставки можно составить для хранения в растворе с одним или более подходящими стабилизаторами. Можно использовать без ограничения любой такой стабилизатор, известный специалисту в данной области. Например, стабилизаторы, подходящие для лиофилизированных препаратов, включают в себя, но без ограничения, сахара, соли, поверхностно-активные вещества, белки, хаотропные средства, липиды и аминокислоты. Стабилизаторы, подходящие для жидких препаратов, включают в себя, но без ограничения, сахара, соли, поверхностно-активные вещества, белки, хаотропные средства, липиды и аминокислоты. Конкретные стабилизаторы, которые можно использовать в композициях, включают в себя, но без ограничения, трегалозу, сывороточный альбумин, фосфатидилхолин, лецитин и аргинин. Другие соединения, композиции и способы стабилизации лиофилизированного или жидкого препарата конструкций доставки можно найти, например, в патентах США №№ 6573237, 6525102, 6391296, 6255284, 6133229, 6007791, 5997856 и 5917021.

[381] В разных вариантах осуществления фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию составляют для пероральной доставки. Фармацевтические композиции, составленные для перорального введения, обладают преимуществом способности бактериального токсина опосредовать трансцитоз через желудочно-кишечный (GI) эпителий и/или доставку во внутреннюю часть клетки эпителия GI (например, желудка). Ожидается, что пероральное введение этих фармацевтических композиций приведет к абсорбции конструкции доставки через поляризованные

эпителиальные клетки слизистой оболочки пищеварительного тракта, например, слизистой оболочки кишечника, за которым следует высвобождение биологически активного груза на базолатеральной стороне слизистой мембраны. В разных вариантах осуществления эпителиальную клетку выбирают из группы, состоящей из назальных эпителиальных клеток, эпителиальных клеток полости рта, эпителиальных клеток кишечника, эпителиальных клеток прямой кишки, вагинальных эпителиальных клеток и легочных эпителиальных клеток. Фармацевтические композиции согласно раскрытию могут содержать добавление энхансера трансцитоза для облегчения переноса белка слияния через эпителий GI. Такие энхансеры известны в данной области. См. Xia et al., (2000) J. Pharmacol. Experiment. Therap., 295:594-600; и Xia et al. (2001) Pharmaceutical Res., 18(2):191-195, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

[382] Не связывая себя какой-либо теорией, предполагается, что после переноса через эпителий GI, конструкции доставки согласно раскрытию будут демонстрировать увеличенный период полужизни в сыворотке, то есть биологически активный груз конструкций доставки будет демонстрировать увеличенный период полужизни в сыворотке по сравнению с биологически активным грузом в неслитом состоянии. В связи с этим пероральные составы фармацевтических композиций согласно настоящему раскрытию получают таким образом, чтобы они подходили для транспортировки в эпителий GI и для защиты конструкций доставки в желудке. Такие составы могут содержать носитель и диспрегирующие компоненты и могут быть в любой подходящей форме, включая аэрозоли (для пероральной или легочной доставки), сиропы, эликсиры, таблетки, включая расжевываемые таблетки, твердые или мягкие капсулы, пастилки, троше, водные или масляные суспензии, эмульсии, грануляты в облатках или пеллетах, и дипергируемые порошки. В разных вариантах осуществления фармацевтические композиции используют в твердых лекарственных формах, например, таблетках, капсулах и тому подобное, подходящих для простого пероральное введение точных дозировок.

[383] Пероральный состав может содержать конструкцию доставки и одно или несколько соединений, которые могут защищать конструкцию доставки во время нахождения в желудке. Например, защитное соединение должно быть способно предотвращать кислотный и/или ферментативный гидролиз конструкции доставки. В разных вариантах осуществления пероральный состав содержит конструкцию доставки и одно или несколько соединений, которые могут облегчать прохождение конструкции из желудка в тонкий кишечник. Одно или несколько соединений, которые могут защищать конструкцию доставки от разрушения в желудке могут также облегчать прохождение конструкции из желудка в тонкий кишечник. Например, включение бикарбоната натрия может быть полезным для облегчения быстрого перемещения внутрижелудчных доставляемых материалов из желудка в двенадцатиперстную кишку, которая описана в Mrsny et al., Vaccine 17:1425-1433, 1999. Другие способы составления композиций так, чтобы конструкции доставки могли проходить через желудок и контактировать с

поляризованными эпителиальными мембранами в тонком кишечнике, включают в себя, но без ограничения, технологии энтеросолюбильного покрытия, которая описана в DeYoung, Int J Pancreatol, 5 Suppl:31-6, 1989, и способы, представленные в патентах США №№ 6613332, 6174529, 6086918, 5922680 и 5807832, каждый из которых полностью включен в настоящее описание посредством ссылки.

[384] Фармацевтические композиции, предназначенные для перорального применения, можно получать согласно любому способу, известному в данной области, для изготовления фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать одно или несколько средств, выбираемых из группы, состоящей из подсластителей, чтобы обеспечить фармацевтически первоклассный и вкусный препарат. Например, для получения перорально доставляемых таблеток конструкцию доставки смешивают по меньшей мере с одним фармацевтическим вспомогательным веществом, и твердый состав прессуют с образованием таблетки согласно известным способам для доставки в желудочно-кишечный тракт. таблетированную композицию обычно составляют с добавками, например, сахаридным или целлюлозным носителем, связующим веществом, таким как крахмальная паста или метилцеллюлоза, наполнителем, разрыхлителем или другими добавками, обычно используемыми с целью получения медицинских препаратов. Для получения перорально доставляемых капсул DHEA смешивают по меньшей мере с одним фармацевтическим вспомогательным веществом, и твердый состав помещают в капсульный контейнер, подходящий для доставки в желудочно-кишечный тракт. Композиции, содержащие конструкции доставки, можно получать, как в общем описано в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton Pa. 18042) в главе 89, который включен в настоящее описание посредством ссылки.

[385] Фармацевтические композиции можно составлять в виде таблеток для перорального применения, содержащих конструкции доставки в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, которые подходят для изготовления таблеток. Этими вспомогательными веществами могут быть инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия; гранулирующие и разрыхляющие средства, например, кукурузный крахмал, желатин или гуммиарабик, и смазывающие средства, например, стеарат магния, стеариновая кислота или тальк. таблетки могут быть без покрытия, или они могут быть покрыты с помощью известных методов для замедления распада и абсорбции в желудочно-кишечном тракте и, таким образом, обеспечивают длительное действие в течение более продолжительного периода времени. Например, можно использовать материал для задержки времени, такой как моностеарат глицерина или дистеарат глицерина отдельно или с воском.

[386] Фармацевтические композиции можно составлять в виде твердых желатиновых капсул, в которых конструкции доставки смешивают с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином или в виде мягких желатиновых капсул, в которых конструкция доставки смешана с водной или

масляной средой, например, арахисовым маслом, маслом земляного ореха, жидким парафином или оливковым маслом.

[387] Водные суспензии могут содержать конструкцию доставки в смеси с вспомогательными веществами, подходящими для изготовления водных суспензий. Такими вспомогательными веществами являются суспендирующие средства, например, карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующими или смачивающими средствами могут быть существующий в природе фосфатид, например, лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например, полиоксиэтиленстеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, гептадецилэтилоксицетанол, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такими как полиоксиэтиленсорбитолмоноолеат, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита, например, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Водные суспензии также могут содержать один или более консервантов, например, этил или n-пропил p-гидроксибензоат, один или более красителей, один или более ароматизаторов и один или более подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

[388] Масляные суспензии можно составить путем суспендирования конструкции доставки в растительном масле, например, арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Масляные суспензии могут содержать загущающее средство, например, пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Чтобы обеспечить вкусный пероральный препарат, можно добавлять подсластители, такие как те, что изложены выше, и ароматизаторы. Эти композиции можно консервировать путем добавления антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота.

[389] Фармацевтические композиции могут быть в форме эмульсий масло в воде. Масляной фазой может быть растительное масло, например, оливковое масло или арахисовое масло или минеральное масло, например, аравийская камедь или трагакантовая камедь, существующие в природе фосфатиды, например, соевый лецитин, и сложные эфиры или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот и ангидридов гексита, например, сорбитанмоноолеат, и продукты конденсации тех же неполных сложных эфиров с этиленоксидом, например, полиоксиэтиленсорбитанмоноолеат. Эмульсии также могут содержать подсластители и ароматизаторы.

[390] Фармацевтическая композиция может быть в форме таблетки или капсулы, и таблетка или капсула может быть покрыта или инкапсулирована для защиты терапевтически или биологически активного груза от ферментативного действия в желудке и чтобы обеспечить абсорбцию у субъекта достаточного количества биологически активного груза для получения эффективного ответа. Такие способы

нанесения покрытия или инкапсуляции включают в себя, например, инкапсуляцию в наночастицы, состоящие из полимеров с гидрофобной основной цепью и гидрофильными ответвлениями в качестве носителей лекарственного средства, инкапсуляцию в микрочастицы, вставку в липосомы в эмульсиях, и конъюгацию с другими молекулами. В некоторых случаях капсула или таблетка высвобождает конструкцию доставки зависимым от pH образом. Капсулы или таблетки, используемые для введения конструкции доставки, которая описана в настоящей заявке, могут содержать одно или несколько энтеросолюбильных покрытий.

[391] Примеры наночастиц включают в себя мукоадгезивные наночастицы, покрытые хитозаном и карбополом (Takeuchi et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 47(1):39-54, 2001) и наночастицы, содержащие заряженные комбинированные полиэфиры, поли(2-сульфобутил-виниловый спирт) и поли(сополимер D, L-молочной кислоты и гликолевой кислоты) (Jung et al. Eur. J. Pharm. Biopharm. 50(1):147-160, 2000).

[392] Можно использовать инкапсулированные таблетки или таблетки с покрытием, которые послойно высвобождают биологически активный груз, высвобождая таким образом, биологически активный груз в течение заданного периода времени при перемещении по желудочно-кишечному тракту. Кроме того, таблетки, содержащие биологически активный груз, можно поместить в более крупную таблетку, защищая таким образом, внутреннюю таблетку от условий окружающей среды и обработки, таких как температура, химические средства (например, растворители), pH и влажность. Наружная таблетка и покрытия дополнительно служат для защиты биологически активного груза в желудочной среде.

[393] Фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, можно составить для пероральной доставки с использованием полиэфирных микросфер, зеиновых микросфер, протеиноидных микросфер, полицианоакрилатных микросфер и систем на основе липидов (см. Например, DiBase and Morrel, илиal Delivery of Microencapsulated Proteins, in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 255-288 (Plenum Press 1997)).

[394] Поверхностно-активные средства или поверхностно-активные вещества способствуют абсорбции полипептидов через слизистую оболочку или выстилку. Полезные поверхностно-активные средства или поверхностно-активные вещества включают в себя жирные кислоты и их соли, желчные соли, фосфолипид или алкилсахарид. Примеры жирных кислот и их солей включают в себя натриевые, калиевые и лизиновые соли каприлата (C8), капрата (C_{10}), лаурата (C_{12}) и миристата (C_{14}). Примеры желчных солей включают в себя холевую кислоту, хенодезоксихолевую кислоту, гликохолевую кислоту, таурохолевую кислоту, гликохенодезоксихолевую кислоту, таурохенодезоксихолевую кислоту, дезоксихолевую кислоту, гликодезоксихолевую кислоту, тауродезоксихолевую кислоту, литохолевую кислоту и урсодезоксихолевую кислоту. Примеры фосфолипидов включают в себя одноцепочечные фосфолипиды, такие как лизофосфатидилхолин, лизофосфатидилглицерин, лизофосфатидилэтаноламин,

лизофосфатидилинозитол и лизофосфатидилсерин; или двухцепочечные фосфолипиды, такие как диацилфосфатидилхолины диацилфосфатидилглицерины, диацилфосфатидилэтаноламины, диацилфосфатидилинозитолы и диацилфосфатидилсерины. Примеры алкилсахаридов включают в себя алкилглюкозиды или алкилмальтозиды, такие как децилглюкозид и додецилмальтозид.

[395] Настоящее раскрытие относится к способам и композициям, которые обеспечивают пероральное введение фармацевтических композиций согласно раскрытию. Не желая связывать себя какой-либо конкретной теорией или механизмом действия, считается, что пероральное введение конструкций доставки приводит к абсорбции конструкции доставки через поляризованные эпителиальные клетки слизистой оболочки пищеварительного тракта, например, слизистой оболочки кишечника, за которым следует расщепление конструкции доставки и высвобождение биологически активного груза на базолатеральной стороне слизистой мембраны. Таким образом, когда биологически активный груз проявляет биологическую активность в печени, такую как, например, активность, опосредованную связыванием IL-10 со своим когнатным рецептором, считается, что биологически активный груз оказывает превышающий ожидание эффект на основе концентрации в плазме, наблюдаемой у субъекта, то есть пероральное введение конструкции доставки может обеспечивать более высокую эффективную концентрацию доставленного биологически активного груза в печень субъекта, чем наблюдается в плазме субъекта.

[396] Настоящее раскрытие относится к способам перорального введения фармацевтических композиций согласно раскрытию. Такие способы могут включать в себя, но без ограничения, стадии перорального введения композиций пациентом или лицом, осуществляющим уход. Такие стадии введения могут включать введение с интервалами, например, один или два раза в день в зависимости от конструкции доставки, заболевания или состояния пациента или отдельного пациента. Такие способы также включают в себя введение различных дозировок отдельной конструкции доставки. Например, начальная дозировка фармацевтической композиции может быть на более высоком уровне, чтобы вызвать нужный эффект, такой как снижение уровней глюкозы в крови. Затем последующие дозировки можно уменьшить после достижения нужного эффекта. Такие изменения или модификации протоколов введения может выполнить лечащий врач или медицинский работник.

[397] Эти фармацевтические композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Режим дозирования может определить лечащий врач на основе конкретных клинических факторов. Как хорошо известно в области медицины, дозировки для любого пациента зависят от многих факторов, включая размер, площадь поверхности тела, возраст пациента, конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие одновременно вводимые лекарственные средства. терапевтически эффективное количество для этой ситуации будет легко определено с помощью стандартных экспериментов и находится в пределах компетенции

и суждения рядового клинического работника или врача. Специалисту известно, что эффективное количество фармацевтической композиции, вводимой индивидууму, среди прочего будет зависеть от природы биологически активного груза. Продолжительность лечения, необходимая для наблюдения за изменениями и интервал после лечения, чтобы произошел ответ, меняются в зависимости от нужного эффекта. Конкретные количества можно определить с помощью обычных тестов, которые хорошо известны специалисту в данной области.

[398] Количеством биологически активного груза является количество, эффективное для достижения цели конкретного активного средства. Количество в композиции обычно представляет собой фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективное количество. Однако количество может быть меньше фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективного количества, когда композицию используют в стандартной лекарственной форме, такой как капсула, таблетка или жидкость, потому что стандартная лекарственная форма может содержать множество композиций носителя/биологически или химически активного средства или может содержать разделенное фармакологически, биологически, терапевтически или химически эффективное количество. Затем общие эффективные количества можно вводить в виде накопительных единиц, содержащих в общей сложности фармакологически, биологически, терапевтически или химически активные количества биологически активного груза.

[399] В рамках настоящего изобретения термины «совместное введение», «совместно вводимый» и «в комбинации с», относящиеся к конструкциям доставки согласно раскрытию и одному или нескольким другим терапевтическим средствам, предназначены для обозначения и относятся и включают в себя следующее: одновременное введение такой комбинации конструкций доставки согласно раскрытию и терапевтического средства (средств) нуждающемуся в лечении пациенту, когда такие компоненты составлены вместе в одной лекарственной форме, которая высвобождает указанные компоненты по существу одновременно для указанного пациента; по существу одновременное введение такой комбинации конструкций доставки согласно раскрытию и терапевтического средства (средств) нуждающемуся в лечении пациенту, когда такие компоненты составлены отдельно друг от друга в виде отдельных лекарственных форм, которые указанный пациент принимает по существу одновременно, при этом указанные компоненты высвобождаются для указанного пациента по существу одновременно; последовательное введение такой комбинации конструкций доставки согласно раскрытию и терапевтического средства (средств) нуждающемуся в лечении пациенту, когда такие компоненты составлены отдельно друг от друга в виде отдельных лекарственных форм, которые указанный пациент принимает последовательно со значительным временным интервалом между каждым введением, при этом указанные компоненты высвобождаются для указанного пациента по существу в разное время; и последовательное введение такой комбинации конструкций доставки согласно раскрытию и терапевтического средства

(средств) нуждающемуся в лечении пациенту, когда такие компоненты составлены вместе в одной лекарственной форме, которая высвобождает указанные компоненты контролируемым образом, при этом они высвобождаются для указанного пациента параллельным, последовательным и/или перекрывающимся образом в одно и то же и/или в разное время, причем каждую часть можно вводить либо таким же, либо другим путем.

[400] Комбинированная терапия может включать одновременное введение композиции выделенной конструкции доставки и композиции второго средства, либо в одной и той же фармацевтической композиции, либо в отдельных фармацевтических композициях. В разных вариантах осуществления композиция выделенной конструкции доставки и композиция второго средства вводят последовательно, то есть композиция выделенной конструкции доставки вводят либо перед или после введения композиции второго средства.

[401] Введение композиции выделенной конструкции доставки и композиции второго средства может быть одновременным, то есть период введения композиции выделенной конструкции доставки и композиции второго средства перекрывают друг друга.

[402] Введение композиции выделенной конструкции доставки и композиции второго средства может быть не одновременным. Например, в разных вариантах осуществления введение композиции выделенной конструкции доставки заканчивают перед введением композиции второго средства. Введение композиции второго средства можно закончить перед введением композиции выделенной конструкции доставки.

Способы лечения

[403] фармацевтические композиции, составленные для пероральной доставки, можно использовать для лечения некоторых классов заболеваний или медицинских состояний, которые особенно подходят для перорального состава и доставки. Такие классы заболеваний или состояний включают в себя, например, вирусные заболевание или инфекции, рак, нарушение обмена веществ, ожирение, аутоиммунные заболевания, воспалительные заболевания, аллергию, болезнь «трансплантат против хозяина», системную мокробную инфекцию, анемию, сердечно-сосудистое заболевание, психоз, генетические заболевания, нейродегенеративные заболевания, нарушения кроветворных клеток, заболевания эндокринной системы или репродуктивной системы, желудочно-кишечные заболевания. При многих хронических заболеваниях пероральные составы конструкций доставки согласно раскрытию особенно полезны, потому что они обеспечивают длительный уход за пациентом и терапию посредством перорального введения в домашних условиях без зависимости от инъекционного лечения или протоколов лекарственных препаратов.

[404] Фармацевтическая композиция согласно настоящему раскрытию может содержать любую из конструкций доставки, описанных в настоящей заявке, которая содержит любую комбинацию носителя, груза и/или спейсера, описанных в настоящей заявке. Конкретно, конструкции доставки, описанные в настоящей заявке, обеспечивают

пероральное введение, за которым может следовать транспортировка конструкции доставки через клетку эпителия субъекта или в нее. Конструкция доставки, которая была транспортирована через такой эпителиальный слой, может впоследствии достигать различных частей и/или органов и/или тканей у субъекта. Конструкция доставки, и в различных случаях груз, который конструкция доставки содержит, могут вызывать эффект при достижении подслизистого компартмента. Например, биологически активным грузом может быть груз, способный вызывать иммунный ответ, и, таким образом, конструкция доставки может представлять такой груз иммунным клеткам, как только они достигают подслизистого компартмента.

[405] Настоящее раскрытие относится к способам лечения, профилактики и/или предотвращения воспалительного заболевания у субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. «Воспалительные заболевания» включают в себя все заболевания, связанные с острым или хроническим воспалением. Острое воспаление - это первоначальная реакция организма на вредные раздражители, которая возникает в результате повышенного движения плазмы и лейкоцитов (таких как, например, гранулоциты) из крови в поврежденные ткани. Ряд биохимических явлений способствует развитию воспалительного ответа, вовлекая местную сосудистую систему, иммунную систему и различные клетки в поврежденной ткани. Длительное воспаление называется хроническим воспалением, которое приводит к прогрессивному изменению типа клеток, присутствующих в месте воспаления, и характеризуется одновременным разрушением и заживлением ткани в результате воспалительного процесса. Воспалительные заболевания могут быть вызваны, например, ожогами, химическими раздражителями, обморожением, токсинами, инфекцией патогенными микроорганизмами, физическими травмами, иммунными реакциями из-за гиперчувствительности, ионизирующего излучения или инородных тел, таких как, например, осколки, грязь и мусор. Примеры воспалительных заболеваний хорошо известны в данной области.

[406] Воспалительное заболевание можно выбрать из группы, состоящей из воспалительного заболевания кишечника, псориаза и бактериального сепсиса. В рамках настоящего изобретения термин «воспалительное заболевание кишечника» относится к группе воспалительных состояний толстой и тонкой кишки, включая, например, болезнь Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, синдром Бехчета и неопределенный колит. Конструкции доставки, которые можно использовать для предотвращения и/или лечения такого воспалительного заболевания, включают в себя те, что содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154 и/или SEQ ID NO: 155.

[407] «Болезнь Крона», в соответствии с настоящим раскрытием, представляет собой воспалительное заболевание кишечника Т-хелперного типа 1 (Th1), которое имеет характер иммунного ответа, который включает повышенную выработку интерлейкина-12, фактора некроза опухоли (TNF) и интерферона-γ (Romagnani. Inflamm Bowel Dis 1999; 5:

285-94), которые могут оказывать разрушительное влияние на образ жизни пациента, страдающего этим заболеванием. Общие симптомы болезни Крона включают диарею, спазмы, боль в животе, лихорадку и даже ректальное кровотечение. Болезнь Крона и связанные с ней осложнения часто приводят к тому, что пациенту требуется хирургическое вмешательство, часто более одного раза. Не существует известного лекарства от болезни Крона, а варианты долгосрочного эффективного лечения ограничены. Цели лечения состоят в том, чтобы контролировать воспаление, исправлять дефицит питательных веществ и облегчить такие симптомы, как боль в животе, диарея и кровотечение из прямой кишки. Хотя лечение может помочь контролировать болезнь, уменьшая количество рецидивов, лекарства нет. Лечение может включать лекарственные препараты, пищевые добавки, хирургическое вмешательство или комбинацию этих вариантов. Обычные методы лечения, которые можно вводить для лечения, включают противовоспалительные препараты, включая сульфасалазин, кортизон или стероиды, включая преднизон, супрессоры иммунной системы, такие как 6-меркаптопурин или азатиоприн, и антибиотики.

[408] «Псориаз» в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой заболевание, поражающее кожу и суставы. Обычно оно вызывает появление красных чешуйчатых пятен на коже. Чешуйчатые пятна, вызванные псориазом, называемые псориатическими бляшками, являются областями воспаления и чрезмерного образования кожи. Кожа на этих участках быстро скапливается и приобретает серебристо-белый цвет. Бляшки часто возникают на коже локтей и колен, но могут поражать любую область, включая кожу головы и гениталии. Предполагается, что псориаз является иммуноопосредованным и не заразен. Расстройство представляет собой хроническое рецидивирующее состояние, тяжесть которого меняется от небольших локализованных пятен до полного покрытия тела. Ногти пальцев рук и ног часто поражаются (псориатическая дистрофия ногтей), и это можно рассматривать как отдельный симптом. Псориаз также может вызывать воспаление суставов, известное как псориатический артрит. От десяти до пятнадцати процентов людей с псориазом страдают псориатическим артритом.

[409] В рамках настоящего изобретения термин «бактериальный сепсис» относится к опасным для жизни состояниям, возникающим в результате циркуляции бактерий в кровотоке. Сепсис приводит к генерализованной системной выработке провоспалительных цитокинов, что приводит к повреждению тканей и, в конечном итоге, к септическому шоку из-за нарушения микроциркуляции.

[410] Настоящее раскрытие относится к способам лечения, профилактики и/или предотвращения аутоиммунного заболевания у субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. В рамках настоящего изобретения аутоиммунное заболевание представляет собой заболевание или расстройство, возникающее из собственных тканей индивидуума и направленное против них, или их совокупность, или их проявление, или возникающее из них состояние. В

разных вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из системной красной волчанки (SLE), вульгарной пузырчатки, миастении гравис, гемолитической анемии, тромбоцитопенической пурпуры, болезни Грейвса, болезни Шегрена, дерматомиозита, болезни Хашимото, полимиозита, воспалительного заболевания кишечника, рассеянного склероза (MS), сахарного диабета, ревматоидного артрита и склеродермии. Иллюстративные конструкции доставки, которые можно использовать для лечения этих заболеваний, могут включать в себя те, что содержат любой носитель SEQ ID NO: 4 - SEQ ID NO: 125, связанный, например, с антителом против TNFa или его функциональнымм связывающимм фрагментами.

[411] «Ревматоидный артрит» в соответствии с настоящим раскрытием представляет собой аутоиммунное заболевание, которое заставляет иммунную систему организма атаковать костные суставы (Muller B et al., Springer Semin. Immunopathol., 20: 181-96, 1998). Ревматоидный артрит - это хроническое системное воспалительное заболевание, которое может поражать многие ткани и органы, но в основном поражает синовиальные суставы. Этот процесс вызывает воспалительную реакцию синовиальной оболочки (синовит), вторичную по отношению к гиперплазии синовиальных клеток, избытку синовиальной жидкости и развитию паннуса в синовиальной оболочке. Патология болезненного процесса часто приводит к разрушению суставного хряща и анкилозу суставов. Ревматоидный артрит также может вызывать диффузное воспаление легких, перикарда, плевры и склеры, а также узловые поражения, наиболее часто встречающиеся в подкожной клетчатке под кожей.

[412] Настоящее раскрытие относится к способам и композициям для лечения, профилактики и/или предотвращения рака у субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. Подлежащие лечению виды рака включают в себя, но без ограничения, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, хроническую лимфоцитарную лейкемию, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественную миелому, карциномы поджелудочной железы, толстой кишки, желудка, кишечника, предстательной железы, мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки, злокачественную меланому и резистентную к ритуксимабу NHL и лейкемию.

[413] Терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию будет вводиться в комбинации с одним или более другими терапевтическими средствами. Такие терапевтические средства могут быть приняты в данной области в качестве стандартного лечения конкретного болезненного состояния, которое описано в настоящей заявке, такого как воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание или рак. Рассматриваемые иллюстративные терапевтические средства включают в себя, но без ограничения, цитокины, факторы роста, стероиды, NSAID, DMARD, противовоспалительные средства, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства или другие активные и вспомогательные средства.

[414] Настоящее раскрытие относится к способам лечения, профилактики и/или

предотвращения нарушения обмена веществ у субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. В разных вариантах осуществления нарушение обмена веществ выбирают из группы, состоящей из: диабета, ожирения, диабета вследствие ожирения, гипергликемии, дислипидемии, гипертриглицеридемии, синдрома X, инсулинорезистентности, нарушения толерантности к глюкозе (IGT), диабетической дислипидемии и гиперлипидемии.

[415] Настоящее раскрытие относится к способам лечения, профилактики и/или предотвращения жировой болезни печени (например, неалкогольной жировой болезни печени (NAFLD); неалкогольного стеатогепатита (NASH)), желудочно-кишечного заболевания или нейродегенеративного заболевания у субъекта, включающим введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию.

[416] Настоящее раскрытие относится к способам и композициям для лечения, профилактики и/или предотвращения нарушения роста из-за дефицита GH у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию. В разных вариантах осуществления расстройство выбирают из группы, состоящей из: дефицита гормона роста (GHD), синдрома Тернера (TS), синдрома Нунан, синдрома Прадера-Вилли, дефицита гомеобокс-содержащего гена низкого роста (SHOX), хронической почечной недостаточности и синдрома короткой кишки с идиопатической низкорослостью, дефицита GH из-за редких опухолей гипофиза или их лечения и болезни истощения мышечной ткани, связанного с HIV/AIDS.

[417] Субъектом согласно настоящему раскрытию может быть человек или грызун. Субъектом может быть человек. У субъекта может быть одно или несколько следующих заболеваний: воспалительное заболевание кишечника, псориаз, бактериальный сепсис, системная красная волчанка (SLE), вульгарная пузырчатка, миастения гравис, гемолитическая анемия, тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Грейвса, болезнь Шегрена, дерматомиозит, болезнь Хашимото, полимиозит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз (MS), сахарный диабет, ревматоидный артрит, склеродермия, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, хроническая лимфоцитарная лейкемия, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественная миелома, карцинома мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки, злокачественная меланома, резистентная к ритуксимабу NHL или лейкемия, диабет, ожирение, диабет вследствие ожирения, гипергликемия, дислипидемия, гипертриглицеридемия, синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическая дислипидемия, гиперлипидемия, дефицит гормона роста (GHD), синдром Тернера (TS), синдром Нунан, синдром Прадера-Вилли, дефицит гомеобокс-содержащего гена низкого роста (SHOX), хроническая почечная недостаточность или синдром короткой кишки с идиопатической низкорослостью.

[418] Способы и композиции, описанные в настоящей заявке, также можно использовать для диагностики заболевания или состояния. Диагностика заболевания или

состояния может включать в себя инвазивные и неинвазивные методы диагностики. В частности, композиции, описанные в настоящей заявке, можно использовать для неинвазивной диагностики заболевания, например, путем измерения экспрессии определенного маркера (например, биомаркера) или антигена. Такую диагностику можно проводить путем путем связывания груза с носителем, причем груз может иметь аффинность связывания с определенным маркером (например, типовой биомолекулой, наличие или концентрация которой в определенном органе, ткани или клетке является репрезентативным для определенного заболевания или состояния). Диагностика, которая описана в настоящей заявке, может дополнительно включать мониторинг ответа на лечение (например, лечение субъекта). Например, если ответ на лечение коррелирует с уменьшением определенного маркера (например, биомаркера), конструкции доставки согласно настоящему раскрытию можно использовать для измерения такого маркера в определенном месте (например, в определенной популяции иммунных клеток в подслизистом компартменте). В дополнение к неинвазивной диагностике способы и композиции, описанные в настоящей заявке, можно использовать для получения биологически и/или терапевтически релевантной информации, например, после того, как у субъекта взят образец биопсии, за которым можно следить с помощью иммуногистохимии, например обнаружения накопления конструкции доставки в определенной ткани и так далее.

[419] Неинвазивная диагностика может включать молекулярную и/или ядерную визуализацию. Например, конструкция доставки может содержать груз, меченный флуоресцентным и/или радиоактивным соединением, чтобы после введения у субъекта можно было определить местоположение и/или концентрацию такой конструкции доставки. Любой применимый для диагностики фрагмент, который описан в настоящей заявке, можно использовать, чтобы обеспечить диагностические и/или тераностические (терапевтические и диагностические) средства.

Полинуклеотиды, кодирующие Конструкции доставки

[420] В способах и композициях согласно настоящему раскрытию представлены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептиды не существующих в природе конструкций доставки и/или гибридных конструкций доставки. Эти полинуклеотиды можно использовать, например, для получения полипептидов конструкций доставки и/или гибридных конструкций доставки. В раскрытии представлена система экспрессии, которая содержит рекомбинантную полинуклеотидную последовательность, кодирующую рецепторсвязывающий домен бактериального носителя, и сайт встраивания полиспейсера для полинуклеотидной последовательности, кодирующей биологически активный груз. Сайт встраивания полиспейсера может находиться в любом месте полинуклеотидной последовательности при условии, что вставка полиспейсера не нарушает конструкцию доставки бактериального токсина. Система экспрессии может содержать полинуклеотидную последовательность, которая кодирует расщепляемый спейсер так, что расщепление

расщепляемого спейсера отделяет биологически активный груз, кодируемый нуклеиновой кислотой, вставленной в сайт встраивания полиспейсера от остальной части кодируемой конструкции доставки. Таким образом, в вариантах осуществления, где сайт встраивания полиспейсера находится на конце кодируемой конструкции, полинуклеотид содержит одну нуклеотидную последовательность, кодирующую расщепляемый спейсер между сайтом встраивания полисспейсера и остальной частью полинуклеотида. В вариантах осуществления, в которых сайт встраивания полисспейсера не находится на конце кодируемой конструкции, сайт встраивания полисспейсера можно фланкировать нуклеотидными последовательностями, каждая из которых кодирует расщепляемый спейсер.

[421] Различные методы in vitro, которые можно использовать для получения полинуклеотида, кодирующего конструкцию доставки, используемую в конструкциях доставки согласно раскрытию, включают, но без ограничения, обратную транскрипцию, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), лигазную цепную реакцию (LCR), систему амплификации на основе транскрипции (TAS), систему самоподдерживающейся репликации последовательностей (3SR) и систему амплификации репликазы QP (QB). Можно использовать любой такой метод, известный специалисту в данной области как полезный для конструирования рекомбинантных нуклеиновых кислот. Например, полинуклеотид, кодирующий белок или его часть, можно выделить с помощью полимеразной цепной реакции кДНК с использованием праймеров на основе последовательности ДНК конструкции доставки или нуклеотида, кодирующего рецепторсвязывающий домен.

[422] Руководство по использованию этих методов клонирования и амплификации in vitro описано, например, в патентах США №№ 4683195; Mullis et al., 1987, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263; and Erlich, ed., 1989, ПЦР Technology, Stockton Press, NY. Полинуклеотиды, кодирующие конструкцию доставки или ее часть, также можно выделить путем скрининга геномных библиотек кДНК с использованием зондов, выбранных из последовательностей нужного полинуклеотида, в жестких, умеренно жестких или очень жестких условиях гибридизации.

[423] Кроме того, полинуклеотиды также могут кодировать секреторную последовательность на аминоконце кодируемой конструкции доставки. Такие конструкции полезны для получения конструкций доставки в клетках млекопитающих, поскольку они упрощают выделение полипептидов конструкции доставки и/или гибридной конструкции доставки.

[424] Кроме того, полинуклеотиды согласно раскрытию также охватывают производные варианты полинуклеотидов, кодирующих конструкцию доставки. Такие производные можно получить любым способом, известным специалисту в данной области, без ограничения. Например, производные можно получить путем сайт-специфического мутагенеза, включая замену, вставку или делецию одного, двух, трех, пяти, десяти или более нуклеотидов полинуклеотидов, кодирующих конструкцию

доставки. Альтернативно, производные можно получить путем случайного мутагенеза. Один метод случайного мутагенеза нуклеиновой кислоты включает амплификацию нуклеиновой кислоты в реакции ПЦР в присутствии 0,1 мМ $MnCl_2$ и при несбалансированных концентрациях нуклеотидов. Эти условия увеличивают степень неточности включения полимеразы, используемой в реакции ПЦР, и приводят к случайному мутагенезу амплифицированной нуклеиновой кислоты.

[425] Соответственно, в раскрытии представлен полинуклеотид, который может кодировать одну или несколько конструкций доставки. Конструкция доставки содержит бактериальный носитель и биологически активный груз, подлежащий доставке субъекту; и, необязательно, нерасщепляемый или расщепляемый спейсер. Расщепление расщепляемого спейсера может отделять биологически активный груз от остальной части конструкции доставки. Расщепляемый спейсер можно расщеплять ферментом, который находится на базолатеральной мембране поляризованной эпителиальной клетки субъекта или в плазме субъекта.

[426] Полинуклеотид можно гибридизировать в жестких условиях гибридизации с любым полинуклеотидом согласно этому раскрытию. Полинуклеотид можно гибридизировать в жестких условиях с нуклеиновой кислотой, которая кодирует любую конструкцию доставки согласно раскрытию.

[427] В раскрытии представлены векторы экспрессии для экспрессии полипептидов конструкций доставки и/или гибридных конструкций доставки. Обычно векторы экспрессии представляют собой рекомбинантные полинуклеотидные молекулы, содержащие последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид. Векторы экспрессии можно легко адаптировать для функционирования в прокариотах или эукариотах путем включения соответствующих промоторов, репликационных последовательностей, селектируемых маркеров и т.д., чтобы обеспечить стабильную транскрипцию и трансляцию мРНК. Способы конструирования векторов экспрессии и экспрессии генов в клетках, содержащих векторы экспрессии, хорошо известны в данной области. См. например, Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., and Ausubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.

[428] Полезные промоторы для использования в экспрессионных векторах включают, но без ограничения, промотор металлотионеина, основной поздний промотор конститутивного аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор MRP pol III, конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как немедленный ранний промотор CMV человека) и конститутивный промотор CMV.

[429] Векторы экспрессии должны содержать сигналы экспрессии и репликации, совместимые с клеткой, в которой экспрессируются конструкции доставки. Векторы

экспрессии, пригодные для экспрессии конструкций доставки, включают в себя вирусные векторы, такие как ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы, плазмидные векторы, космиды и тому подобное. Вирусные и плазмидные векторы предпочтительны для трансфекции векторов экспрессии в клетки млекопитающих. Например, вектор экспрессии pcDNA1 (Invitrogen, San Diego, Calif), в котором последовательность контроля экспрессии содержит промотор CMV, обеспечивает хорошие скорости трансфекции и экспрессии в таких клетках.

[430] Векторы экспрессии можно ввести в клетку для экспрессии конструкций доставки любым способом, известным специалисту в данной области, без ограничений. Такие методы включают, но без ограничения, например, прямое поглощение молекулы клеткой из раствора; облегчение захвата посредством липофекции с использованием, например, липосом или иммунолипосом; трансфекцию, опосредованную частицами; и так далее, см., например, Патент США № 5272065; Goeddel et al., eds, 1990, Methods in Enzymology, vol. 185, Academic Press, Inc., CA; Krieger, 1990, Gene Transfer and Expression--A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning--A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY; и Ausubel et al., eds., Current Edition, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, NY.

[431] Векторы экспрессии также могут содержать очищающий фрагмент, который упрощает выделение полипептидов конструкции доставки и/или гибридной конструкции доставки. Например, полигистидиновый фрагмент, например, из шести остатков гистидина, может быть включен на аминотерминальном конце белка. Полигистидиновый фрагмент позволяет удобно выделить белок за одну стадию с помощью никель-хелатной хроматографии. В различных вариантах осуществления очищающий фрагмент можно отщепить от остальной части конструкции доставки после очистки. В других вариантах реализации этот фрагмент не влияет на функцию функциональных доменов конструкции доставки и, следовательно, не требует отщепления.

[432] В настоящем раскрытии представлена клетка, которая может содержать вектор экспрессии для экспрессии полипептидов конструкции доставки и/или гибридной конструкции доставки или их частей. Клетку можно выбрать по ее способности экспрессировать высокие концентрации конструкции доставки для облегчения очистки белка. В разных вариантах осуществления клетка представляет собой прокариотическую клетку, например E. coli. Как описано в примерах, конструкции доставки правильно уложены и содержат соответствующие дисульфидные связи при экспрессии в E. coli. Клеткой является эукариотическая клетка. Подходящие эукариотические клетки включают в себя клетки дрожжей и млекопитающих. Для экспрессии конструкций доставки можно использовать любую клетку млекопитающего, известную специалисту в данной области как полезную для экспрессии рекомбинантного полипептида, без ограничения. Например, для экспрессии конструкций для доставки можно использовать клетки яичника китайского хомячка (CHO). Полипептиды конструкций доставки и/или

гибридных конструкций доставки согласно раскрытию можно получить путем рекомбинации, как описано ниже. Однако конструкции доставки также можно получить с помощью химического синтеза с использованием методов, известных специалистам в данной области.

[433] Конструкции доставки согласно настоящему раскрытию можно получить с использованием множества способов. Выбор способа получения может зависеть от молекулярной структуры конструкции доставки и/или ее компонентов (например, носителя, груза и/или спейсера). Таким образом, для некоторых конструкций доставки для получения такой конструкции доставки могут быть предпочтительными методы органического синтеза. Конструкция доставки согласно настоящему раскрытию может представлять собой полипептид. Такие полипептиды можно получить, например, с использованием метода рекомбинантной ДНК. Обычно, он включает создание последовательности ДНК, которая кодирует конструкцию доставки, помещение ДНК в экспрессионную кассету под контролем конкретного промотора, экспрессию молекулы в хозяине, выделение экспрессированной молекулы и, при необходимости, укладку молекулы в активную конформационную форму.

[434] ДНК, кодирующую конструкции доставки, описанные в настоящей заявке, можно получать любым подходящим способом, включая, например, клонирование и рестрикцию соответствующих последовательностей или прямой химический синтез с помощью таких способов как фосфотриэфирный метод Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99; фосфодиэфирный метод Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151; диэтилфосфорамитидный метод Beaucage et al. (1981) Тетра. Lett. 22: 1859-1862); метод твердой подложки согласно патенту США № 4458066 и тому подобное.

[435] При химическом синтезе получают одноцепочечный олигонуклеотид. его можно преобразовать в двухцепочечную ДНК путем гибридизации с комплементарной последовательностью или путем полимеризации с ДНК-полимеразой с использованием одной цепи в качестве матрицы. Специалисту будет понятно, что, хотя химический синтез ДНК ограничен последовательностями от приблизительно 100 оснований, более длинные последовательности можно получать путем лигирования более коротких последовательностей.

[436] Альтернативно, подпоследовательности можно клонировать, и соответствующие подпоследовательности расщеплять с использованием соответствующих ферментов рестрикции. Затем фрагменты можно лигировать для получения нужной последовательности ДНК. ДНК, кодирующую конструкции доставки согласно настоящему раскрытию, можно клонировать с использованием методов амплификации ДНК, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР). Таким образом, например, ген для биологически активного груза амплифицируют с помощью ПЦР с использованием смыслового праймера, содержащего сайт рестрикции, например, для NdeI, и антисмыслового праймера, содержащего сайт рестрикции для HindIII. Можно получить нуклеиновую кислоту, кодирующую последовательность биологически

активного груза и имеющую концевые сайты рестрикции. Конструкцию доставки, имеющую «комплементарные» сайты рестрикции, можно аналогичным образом клонировать, а затем лигировать с биологически активным грузом и/или со спейсером, соединенным с биологически активным грузом. При лигировании последовательностей нуклеиновой кислоты и вставке в вектор получают вектор, кодирующий биологически активный груз, соединенный с рецепторсвязывающим доменом бактериального носителя. В разных вариантах осуществления ДНК, кодирующую конструкции доставки согласно настоящему раскрытию, искусственно синтезируют, например, с помощью твердофазного синтеза ДНК.

[437] Способы получения, описанные в настоящей заявке, можно использовать для получения конструкций доставки согласно настоящему раскрытию или их (функциональных) вариантов. Например, «Cholix» (также упоминаемый в настоящей заявке как токсин Cholix или экзотоксин Cholix) может охватывать множество функциональных вариантов (например, функциональный род), причем функциональные варианты могут включать в себя один или более вариантов своей аминокислотной последовательности относительно SEQ ID NO: 1, как раскрыто в настоящей заявке. Таким образом, в настоящем раскрытии токсин Cholix, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, использован в качестве эталонной последовательности при упоминании Cholix. Однако, как описано в настоящей заявке, настоящее раскрытие не ограничено Cholix, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, но вместо этого охватывает все варианты Cholix, которые попадают в функциональный род Cholix. Например, вариантом экзотоксина Cholix с аминокислотной последовательностью SEQ ID NI: 1 может быть экзотоксин Cholix, аминокислотная последовательность которого приведена в SEQ ID NO: 2, причем оба варианта способны выполнять одинаковые функции, например, трансцитоз через эпителиальную клетку, и взаимодействовать с одинаковыми рецепторами, такими как рибофилин 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и/или перлекан.

[438] Кроме того, способ получения полипептида до некоторой степени может затрагивать аминокислотную последовательность такого полипептида (например, из-за посттрансляционных модификаций). Например, первый носитель и второй носитель получают в одной и той же системе экспрессии (например, системе экспрессии бактерий, такой как E. coli, или системе экспрессии млекопитающих, такой как клетка CHO). В других случаях и как описано в настоящей заявке, первый носитель и второй носитель получают в разных системах экспрессии (например, системах экспрессии бактерий или млекопитающих). Бактериальные системы экспрессии включают в себя E. coli, а системы экспрессии млекопитающих включают в себя, например, клетки CHO. Получаемый бактериально полипептид может содержать N-кэп, причем N-кэп может содержать еще одну модификацию на N-конце полипептида. N-кэп может содержать N-концевой метиониновый остаток. Примеры полипептидов-носителей, полученных из домена I Cholix, которые можно получать бактериально и которые содержат такой N-концевой

метионин, включают в себя те, что содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107 и SEQ ID NO: 135.

Экспериментальные Способы

[439] **Тестирование на трансцитоз**. Функция трансцитоза выделенных конструкций доставки может быть проверена как функция способности конструкции доставки проходить через эпителиальную мембрану. Поскольку для трансцитоза сначала требуется связывание с эпителиальной клеткой, эти анализы также можно использовать для оценки функции конструкции доставки.

[440] Трансцитозную активность конструкции доставки можно тестировать любым методом, известным специалисту в данной области, без ограничений. В разных вариантах осуществления трансцитозную активность можно тестировать путем оценки способности конструкции доставки проникать в неполяризованную клетку, с которой она связывается. В случае носителя, полученного из Cholix, и не желая связывать себя какой-либо конкретной теорией или механизм действия, в настоящей заявке описано, что функция трансцитоза, которая обеспечивает прохождение конструкции доставки через поляризованные эпителиальные клетки и проникновение в неполяризованные клетки, находится в том же домене, то есть в домене, описанном в настоящей заявке как домен I. Таким образом, способность конструкции доставки проникать в клетку можно оценить, например, путем обнаружения физического присутствия конструкции внутри клетки. Например, конструкция доставки может быть мечена, например, флуоресцентным маркером, и конструкция доставки может подвергаться воздействию клетки. Затем клетки можно промыть, удалив любую конструкцию доставки, которая не попала в клетку, и определить количество оставшейся метки. Обнаружение метки при такой транспортировке указывает на то, что конструкция доставки попала в клетку.

[441] Способность конструкции доставки к трансцитозу можно тестировать путем оценки способности конструкции доставки проходить через поляризованную эпителиальную клетку. Например, конструкция доставки можно метить, например, флуоресцентным маркером (например, RFP) и вводить в контакт с апикальными мембранами слоя эпителиальных клеток. Флуоресценция, обнаруженная на базолатеральной стороне мембраны, образованной эпителиальными клетками, указывает на то, что домен трансцитоза функционирует должным образом.

[442] Трансцитоз in vivo можно тестировать на самцах крыс Wistar. Самцов крыс Wistar можно содержать по 3-5 в клетке с циклом свет/темнота 12/12 часов, и их вес может составлять 225-275 г (возраст примерно 6-8 недель) при отправке на исследование. Эксперименты можно проводить во время световой фазы с использованием протокола без восстановления, в котором используют непрерывную анестезию изофлураном. Можно сделать разрез брюшной полости по средней линии 4-5 см, который обнажает среднюю часть тощей кишки. Исходные растворы исследуемых препаратов в количестве 3,86 × 10-5 М можно приготовить в солевом растворе с фосфатным буфером (PBS), при этом 50 мкл

(на 250 г крысы) вводят с помощью внутрипросветной инъекции (ILI) с использованием иглы 29-го размера. Затем брыжейку в месте инъекции можно пометить перманентным маркером. По окончании исследования область размером 3-5 мм, которая захватила меченный сегмент кишечника, можно выделить и обработать для микроскопической оценки. Эксперименты in vivo проводят в соответствии с законом Великобритании о животных (научные процедуры) от 1986 г., Директивой Совета Европейских сообществ от 1986 г. (86/609/EEC) и процедурами этической экспертизы Университета Бата.

[443] **Тестирование Расщепления Расщепляемого Спейсера.** Функцию расщепляемого спейсера, как правило, можно проверить с помощью анализа расщепления. Для тестирования расщепляемых спейсеров можно использовать любой подходящий анализ расщепления, известный специалисту в данной области, без ограничения. Как клеточные, так и внеклеточные анализы можно использовать для проверки способности фермента расщеплять расщепляемые спейсеры.

[444] Иллюстративный бесклеточный анализ для тестирования расщепления расщепляемых спейсеров включает приготовление экстрактов поляризованных эпителиальных клеток и воздействие на меченую конструкцию для доставки, несущую расщепляемый спейсер, фракции экстракта, которая соответствует ассоциированным с мембраной ферментам. В таких анализах метку можно прикрепить либо к доставляемому биологически активному грузу, либо к остальной части конструкции доставки. К числу этих ферментов относятся ферменты расщепления, обнаруженные вблизи базолатеральной мембраны поляризованной эпителиальной клетки, как описано выше. Расщепление можно обнаружить, например, путем связывания конструкции доставки, например, с антителом, и отмывания несвязавшихся молекул. Если метка прикреплена к биологически активному грузу, который должен быть доставлен, то на молекуле, связанной с антителами, метки должно быть мало или она отсутствует. Альтернативно, связывающее средство, используемое в анализе, может быть специфичным для биологически активного груза, а оставшаяся часть конструкции может быть мечена. В любом случае можно оценить расщепление.

[445] Расщепление также можно тестировать с использованием анализов на основе клеток, в которых расщепление тестируют с помощью поляризованных эпителиальных клеток, собранных на полупроницаемых мембранах. Например, меченая конструкция доставки или часть конструкции доставки, содержащая расщепляемый спейсер, может контактировать либо с апикальной, либо с базолатеральной стороной монослоя подходящих эпителиальных клеток, таких как, например, клетки Caco-2, в условиях которые допускают расщепление спейсера. Расщепление можно обнаружить путем обнаружения наличия или отсутствия метки с использованием реагента, который специфически связывает конструкцию доставки или ее часть. Например, антитело, специфичное для конструкции доставки, можно использовать для связывания конструкции доставки, содержащей метку, расположенную дистально к расщепляемому спейсеру по отношению к части конструкции доставки, связанной с антителом. Затем

расщепление можно оценить, обнаружив наличие метки на молекулах, связанных с антителом. Если произошло расщепление, на молекулах, связанных с антителом, метки должно быть мало или она отсутствует. Путем проведения таких экспериментов можно идентифицировать ферменты, которые предпочтительно расщепляют базолатеральную мембрану, а не апикальную мембрану, и, кроме того, можно подтвердить способность таких ферментов расщеплять расщепляемый спейсер в конструкции доставки.

[446] Кроме того, расщепление также можно тестировать с использованием анализа флуоресцентного репортера, как описано в патенте США № 6759207. Вкратце, в таких анализах репортер флуоресценции контактирует с базолатеральной стороной монослоя подходящих эпителиальных клеток в условиях, которые обеспечивают расщепление репортера расщепляющим ферментом. Расщепление репортера изменяет структуру флуоресцентного репортера, изменяя его конфигурацию с нефлуоресцентной на флуоресцентную. Наблюдаемая величина флуоресценции указывает на активность расщепляющего фермента, присутствующего на базолатеральной мембране.

[447] Кроме того, расщепление также можно тестировать с использованием молекулярного зонда с внутримолекулярным гашением, такого как те, что описаны в патенте США № 6592847. Такие зонды обычно содержат флуоресцентный фрагмент, который испускает фотоны при возбуждении светом соответствующей длины волны, и фрагмент-гаситель, который поглощает такие фотоны, когда он находится в непосредственной близости от флуоресцентного фрагмента. Расщепление зонда отделяет гасящий фрагмент от флуоресцентного фрагмента, так что флуоресценцию можно обнаружить, что указывает на то, что расщепление произошло. Таким образом, такие зонды можно использовать для идентификации и оценки расщепления конкретными расщепляющими ферментами путем введения базолатеральной стороны монослоя подходящих эпителиальных клеток в контакт с зондом в условиях, которые обеспечивают расщепление зонда расщепляющим ферментом. Наблюдаемая величина флуоресценции указывает на активность исследуемого расщепляющего фермента.

[448] Исследования in vivo. Крысы-самцы Wistar, содержащиеся группами по 3-5 в клетке с циклом свет/темнота 12/12 часов, имели вес 225-275 г (возраст приблизительно 6-8 недель) при включении в исследование после голодания в течение ночи. Все эксперименты проводили во время световой фазы и проводили с использованием протокола без восстановления, в котором использовали непрерывную анестезию изофлураном. Делали разрез брюшной полости 4-5 см по средней линии для обнажения тонкой кишки (от середины тощей кишки до проксимальных отделов подвздошной кишки). Эквимолярные исходные растворы (PE)-RPF экзотоксина A или усеченных химер Cholix-RFP, приготовленные в солевом растворе с фосфатным буфером, вводили внутрипросветно с помощью иглы для подкожных инъекций 29 размера в объеме 200 мкл/кг (или ~ 50 мкл на 250 г. Крысы). Соседнюю брыжейку каждого участка внутрипросветной инъекции помечали ручкой со стойкими чернилами. В выбранный момент времени животное подвергали эвтаназии, и выделяли область размером 3-5 мм,

которая захватывала отмеченный сегмент кишечника. Все эксперименты проводили в соответствии с законом Великобритании о животных (научные процедуры) 1986 года, Директивой Совета Европейских сообществ 1986 года (86/609/EEC) и процедурами этической экспертизы Университета Бата.

[449] Микроскопия. Выделенные ткани быстро промывали в ледяном PBS, а затем фиксировали 4% параформальдегидом на льду до мечения первичными антителами к экзотоксину A (PE), Cholix или RFP. Распределение в тканях вторичного антитела с флуоресцентной меткой, которое распознает эти первичные антитела, оценивали с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss LSM 510. В качестве ядерного красителя использовали DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол).

[450] Иммуногистохимия. Регидратировать препараты ткани с уменьшением концентраций этанола. Препараты погружают в Histoclear (x2), 100% этанол, 90% этанол, 80% этанол, 70% этанол и PBS на 5 минут каждый. Кипятить препараты в 10 мМ цитрата натрия (pH 6) в течение 10 минут. Остановить кипение и дать остыть в течение 20 минут. Высушить препарат и сделать восковую кайму вокруг каждого среза ткани с помощью гидрофобной ручки ImmEdge. Вымыть срезы тканей путем нанесения пипеткой PBS прямо на ткань. Выполнить 3 промывки по 5 минут. Пермеабилизировать ткани путем нанесения пипеткой на срезы 0,2% Triton x-100 в PBS. Инкубировать при комнатной температуре 45 минут. Промыть PBS 3 раза по 5 минут. Блокировать срезы ткани путем нанесения пипеткой на срезы 2% BSA и 2% ослиной сыворотки в 0,1% Triton x-100 в PBS. Инкубировать 2 часа при комнатной температуре. Удалить блокирующий раствор и добавить первичные антитела. Развести антитела до необходимой концентрации в 0,05% Triton x-100 и 1% BSA в PBS. Инкубировать в течение ночи при 4°C. Промыть 3 раза по 5 минут PBS. Инкубировать со вторичными антителами. Развести антитела до необходимой концентрации в 0,05% Triton x-100 и 1% BSA в PBS. Инкубировать 2 часа при комнатной температуре. Промыть PBS 3 раза по 5 минут. Инкубировать с 200 нМ DAPI при комнатной температуре в течение 45 минут. Промыть PBS 3 раза по 5 минут. Обезвоживать срезы тканей, погружая их в 70% этанол, 100% этанол, Histoclear и 100% этанол на 5 минут в каждый. Нанести каплю среды для заключения fluorshield на каждый срез ткани и накрыть стеклянным покровным стеклом. Осторожно надавить на покровное стекло, чтобы удалить пузырьки воздуха. Обеспечить высыхание среды для заключения в течение 4 часов. Хранить препараты при 4°C и фотографировать с помощью конфокального флуоресцентного микроскопа.

[451] Оценка белков, взаимодействующих с доменом I Cholix. Чтобы идентифицировать партнеров, взаимодействующих с Cholix и/или PE (например, рецепторы, ферменты и т. Д.), и установить везикулярные компартменты, где они взаимодействуют с экзотоксинами Cholix или PE (например, домен I этих экзотоксинов или его усеченный вариант), для определения потенциальных партнеров по взаимодействию можно провести серию поглощений, с последующим связыванием in silico с использованием поверхностного плазмонного резонанса, исследованиями

трансцитоза in vitro с использованием поляризованных эпителиальных клеток Caco-2 кишечника человека, где может быть обеспечен генетический нокдаун определенных мишеней, и исследованиями трансцитоза in vivo, где элементы Cholix и специфические рецепторы могут быть совместно локализованы в установленных везикулярных структурах. Не связывая себя какой-либо теорией, предполагается, что процесс трансцитоза может включать элементы, которые обычно ограничены определенными везикулярными элементами поляризованных эпителиальных клеток кишечника, но могут быть задействованы или «мобилизованы», например, доменом I Cholix или его усеченными авриантами, чтобы покинуть позднюю эндосому и избежать деградации лизосом после апикального рецепторопосредованного эндоцитоза.

ПРИМЕРЫ

[452] Следующие примеры всего лишь иллюстрируют раскрытие, и никоим образом не предназначены для ограничения раскрытия.

ПРИМЕР 1

Получение полученных из Cholix и PE Конструкций Доставки

[453] В этом примере описано иллюстративное получение конструкций доставки, содержащих усеченные носители Cholix (усечение в доменах II и/или Ib) и усеченные носители PE (усечение в доменах II и/или Ib), связанные с гетерологичными грузами. В этом примере различные не существующие в природе конструкции доставки получены в виде единой аминокислотной последовательности, содержащей последовательность модифицированного носителя Cholix и/или последовательность модифицированного носителя PE, полиглицин-сериновую пептидную спейсерную последовательность и гетерологичный груз.

[454] Следующие модифицированные носители Cholix и/или PE получены и используются для получения конструкций 1-12: 1) модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 425 SEQ ID NO: 1 ($Cholix^{425}$, SEQ ID NO: 129); 2) модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 415 SEQ ID NO: 1 ($Cholix^{415}$, SEQ ID NO: 130); 3) модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 397 SEQ ID NO: 1 ($Cholix^{397}$, SEQ ID NO: 131); 4) модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 386 SEQ ID NO: 1 ($Cholix^{386}$, SEQ ID NO: 132); 5) модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 291 SEQ ID NO: 1 ($Cholix^{291}$, SEQ ID NO: 133); 6) модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 265 SEQ ID NO: 1 ($Cholix^{265}$, SEQ ID NO: 4); 7) модифицированный носитель PE, усеченный по аминокислотному остатку 404 SEQ ID NO: 3 (PE^{404}, SEQ ID NO: 140); 8) модифицированный носитель PE, усеченный по аминокислотному остатку 395 SEQ ID NO: 3 (PE^{395}, SEQ ID NO: 141); 9) модифицированный носитель PE, усеченный по аминокислотному остатку 375 SEQ ID NO: 3 (PE^{375}, SEQ ID NO: 142); 10) модифицированный носитель PE, усеченный по аминокислотному остатку 364 SEQ ID NO: 3 (PE^{364}, SEQ ID NO: 143); 11) модифицированный носитель PE, усеченный по

аминокислотному остатку 277 SEQ ID NO: 3 (PE^{277}, SEQ ID NO: 144); и 12) модифицированный носитель PE, усеченный по аминокислотному остатку 252 SEQ ID NO: 3 (PE^{252}, SEQ ID NO: 145). В каждой конструкции 1-12 полиглицин-сериновый пептидный спейсер GTGGS (SEQ ID NO: 201) использовали для присоединения красного флуоресцентного белка (RFP, SEQ ID NO: 220) на С-конце каждого модифицированного токсина. RFP имитировал наличие биологически активного груза.

[455] Из коммерческого источника получили оптимизированные по кодонам гены и клонировали в вектор экспрессии pET26 (+), который использовали для трансформации компонентных клеток E.coli BL21 (DE3) с использованием протокола, предложенного производителем. Клоны отбирали с использованием планшетов с канамицином/агаром, инкубированных в течение ночи при 37°C. Экспрессию белка в ферментированных культурах выбранных клонов обеспечивали с помощью индукции 1 мМ IPTG. Осажденные бактерии лизировали для сбора телец включения, которые тщательно промывали в 50 мМ Tris, 20 мМ EDTA, 2,5% Triton X-100, 0,5 М NaCl, pH 8 перед солюбилизацией, облегченной обработкой ультразвуком в 100 мМ Tris, pH 8, 7 М гуанидина HCl. После центрифугирования для осаждения нерастворимых материалов и добавления дитиотреитола белки в супернатанте повторно укладывали с использованием перемешивающего буфера, содержащего 100 мМ Tris, pH 8, 0,5 М L-аргинина, 1 М мочевины, 2 мМ EDTA, 1 мМ окисленного глутатиона (свежеполученного) и 1 мМ восстановленного глутатиона (свежеполученного), который диализовали при 4°C против 25 мМ Tris, pH 8, 0,1 М мочевины и 1 мМ EDTA. После фильтрации 0,45 мкм нужные белки очищали с использованием ионообменной и эксклюзионной хроматографии. Конечные образцы белка анализировали с помощью электрофореза в SDS-полиакриламидном геле и хранили при -80°C.

ПРИМЕР 2

Эксперименты in vivo по оценке функций доставки молекул-носителей, полученных их экзотоксина

[456] В этом примере описано иллюстративное исследование in vivo для оценки функций эпителиального транспорта и доставки описанных в настоящей заявке молекул носителей, полученных из экзотоксина.

[457] В исследованиях in vivo использовали самцов взрослых крыс линии Wistar в возрасте 7-8 недель со средним весом приблизительно 250 г. При необходимости эксперименты проводили с использованием протокола без восстановления. Как правило, крыс анестезировали с помощью вдыхаемого изофлурана и, при необходимости, умерщвляли вдыханием CO2. Эксперименты начинали с надреза брюшной полости длиной около 4 см для доступа к средней части тощей кишки тонкого кишечника. После разреза примерно 50 мкл приготовленного раствора, содержащего конструкцию доставки или множество конструкций доставки в концентрации примерно 1-1,5 мг/мл, вводили в просвет кишечника области, лишенной пищевых продуктов, через иглу 27 размера с использованием шприца 1 мл. Брыжейку, прилегающую к месту инъекции, метили

маркером, и кишечник возвращали в брюшную полость, при этом разрез закрывали зажимами. В определенные моменты времени кишечник, в который делали инъекцию, извлекали, изолировали хирургическим путем и промывали при 4°C изотоническим раствором PBS.

[458] Промытые и вырезанные образцы фиксировали (4% параформальдегид в PBS) в течение ночи при 4°C перед дегидратацией с помощью ступенчатой серии растворов этанол/вода и инкубацией в течение ночи в хлороформе. Обезвоженные ткани погружали в воск, делали срезы и помещали на предметные стекла с полилизином и обрабатывали для получения антигена с использованием цитрата натрия. После этого срезы пермеабилизировали 0,2% Triton-X100 в PBS перед трехкратной промывкой в PBS и блокированием 2% BSA+2% сывороткой животного, у которого были получены вторичные антитела. Первичные антитела разводили в 1% BSA, 0,1% Triton-X100 в PBS и инкубировали в течение ночи при 4°C в увлажненном воздухе. Флуоресцентные вторичные антитела разводили в 1% BSA, 0,1% Triton-X100 в PBS и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре перед обработкой для конфокальной микроскопии. Иногда для биохимических исследований брали срез кишечника размером примерно 1 см в месте инъекции.

ПРИМЕР 3

Оценка специфических белков-маркеров для Взаимодействия с полученными из Cholix Конструкциями доставки Во время трансцитоза и Внутриклеточной Доставки

[459] В этом примере показан примерный список белков или маркеров для конкретных клеточных компартментов, которые анализировали с использованием иммуногистохимического (IHC) окрашивания и иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии, а также при оценке конструкций доставки согласно настоящему раскрытию.

[460] В следующей таблице 13 показаны иллюстративные используемые в настоящей заявке белковые маркеры, специфичные для клеточного компартмента. Например, полученные из Cholix конструкции доставки, содержащие IL-10 в качестве гетерологичного груза, отслеживали во время экспериментов с использованием либо моноклональных антител (mAb) против IL-10, либо поликлональных антител (pAb), индуцированных против носителя Cholix (например, усеченный домен I).

ТАБЛИЦА 13 - Белковые маркеры, специфичные для клеточного компартмента

Мишень	**pAb/ mAb**	**Видовая реактивность**	**Хозяин**	**Разведение для IHC (P)**	**Примечания**	**Хранение**	**# каталога**
носитель Cholix[386]	pAb		Кролик	1/500	Цельная антисыворотка	-20°C	

IL-10	mAb; pAb	Человека	Мышь, коза	1/25		-20°C	
EEA1	pAb	Мыши, крысы, человека	Кролик	1/200	Ранняя эндосома	-20°C	Ab2900
Rab7	mAb	Мыши, крысы, человека	Кролик	1/100	Поздняя эндосома	-20°C	Ab1267 712
Rab11	pAb	Мыши, крысы, человека, кролик, собаки	Кролик	1/500	Рециркулирующая эндосома	-20°C	Fisher71 -5300
LAMP1	pAb	Мыши, крысы, человека	Кролик	1/500	лизосомный маркер	-20°C	Ab2417 0
GM130	pAb	Мыши, крысы, человека	Кролик	1/500	Cis-Golgi	-20°C	
Glantin	mAb	крысы, человека	Мышь	1/20	Golgi	-20°C	Ab3726 6
58K Golgi белок	mAb	Мыши, крысы, человека	Мышь	1/100	Golgi	-20°C	Nb600-4512
TGN38	mAb	Мыши, крысы, человека	Мышь	1/1000	Транс-Golgi	-20°C	Nb300-575
Калнексин	pAb	Мыши, крысы, человека	Кролик	1/500	Эндоплазматический ретикулум	-20°C	Ab2259 5
Клатрин	mAb	Мыши, крысы, человека	Мышь	1/500	Клатрин-опосредованной эндоцитоз	-20°C	Ab2731

ПРИМЕР 4

Транс-эпителиальная Доставка in vivo полученных из Cholix и PE Носителей, усеченных в домене II или Домене Ib

[461] В этом примере описана трансэпителиальная транспортировка конструкций доставки, содержащих усеченные носители Cholix (например, усечение в доменах II и/или Ib) и усеченные носители PE (например, усечение в доменах II и/или Ib), связанные с биологически активными грузами, через существующий поляризованный эпителий кишечника (например, посредством апикально-базолатерального трансцитоза).

[462] С использованием очищенных изолированных мономерных форм различных конструкций доставки, полученных, как описано в примере 1, провели серию исследований транспортировки in vivo с использованием модели внутрипросветной инъекции у крыс (см. Раздел методов ниже). В этом анализе крысу содержали под анестезией изофлураном на протяжении всего исследования без восстановления. В течение этого времени тонкую кишку обнажают после разреза по средней линии брюшной полости и выбирают область средней части тощей кишки, при этом прилегающую брыжейку идентифицируют с помощью нестираемого маркера. В этом месте использовали объем инъекции 50 мкл для введения ~ 5 мкг конструкций 7-12. Тестируемый белок растворяли в солевом растворе с фосфатным буфером (PBS) и вводили с помощью иглы 28 размера. После внутрипросветной инъекции сегмент тонкой кишки возвращали в брюшную полость и извлекали через определенные промежутки времени.

[463] После извлечения сегмент ткани, подвергнутый воздействию конструкций 7-12, промывали PBS, слегка фиксировали в параформальдегиде и готовили для флуоресцентной микроскопии (см. Раздел о дополнительных методах ниже), где конструкцию доставки выявляли с использованием поликлональных антител против PE или Cholix, которые распознавали с использованием вторичных антител, меченных красным флуоресцентным красителем. Наличие или отсутствие транспортировки конструкций 7-12 показано на фиг. 1 (конструкции 12 (фиг. 1A-фиг. 1C), 11 (фиг. 1D-фиг. 1F) и 10 (фиг. 1G-фиг. 1I)) и фиг. 2 (конструкции 9 (фиг. 2A-фиг. 2C), 8 (фиг. 2D-фиг. 2F) и 7 (фиг. 2G-фиг. 2I)).

[464] Поглощение каждой из конструкций 7-12 в ограниченной популяцией клеток в собственной пластинке соответствовало тому, что наблюдалось ранее для полноразмерного PE. Открытие того, что эффективная трансэпителиальная транспортировка PE через поляризованный эпителий кишечника происходила даже для конструкции 12 (PE^{252}-RFP, например, аминокислота с SEQ ID NO: 137, связанная с аминокислотой с SEQ ID NO: 220), было неожиданным и замечательным, что позволяет предположить, что с помощью элементов, находящихся в домене I (SEQ ID NO: 137) PE, можно обеспечить не только трансэпителиальную транспортировку через поляризованные эпителиальные клетки кишечника, но также нацеливание на конкретные клетки внутри подслизистого компартмент.

[465] Основываясь на неожиданных открытиях с использованием PE-конструкций

7-12, оценили конструкцию 6 (Cholix^{265}-RFP), которая содержит только домен I Cholix (SEQ ID NO: 4). Иммунофлуоресцентная оценка транспортировки Cholix^{265}-RFP (например, аминокислоты SEQ ID NO: 4 или 5, связанной с SEQ ID NO: 220) через тонкий кишечник крысы in vivo дала результат, аналогичный результату, наблюдаемому с конструкцией 12 PE. Оценку с использованием антитела как к компоненту Cholix, так и компоненту RFP использовали для демонстрации того, что оба элемента химеры транспортируются (см., например, фиг. 3). Наблюдаемая картина окрашивания для этих двух антител была сходной, показывая, что оба элемента перемещались по эпителию и попадали в одну и ту же популяцию клеток в собственной пластинке. Эти данные предполагают, что домена I (SEQ ID NO: 4) Cholix может быть достаточно для транспортировки белкового груза (26,9 кДа) и доставки его в выбранную популяцию клеток (фиг. 3A -FIG. 3F).

ПРИМЕР 5

Транспортировки Через Тощую кишку крысы Химерных Конструкций Cholix-PE

[466] В этом примере получали конструкции доставки, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 146 (конструкция 13) и SEQ ID NO: 146 (конструкция 14), и оценивали, как описано выше в примере **2.** химерные конструкции Cholix-PE этого примера содержат смешанные домены I, II, Ib и III либо из экзотоксина Cholix, либо из экзотоксина PE, которые описаны в настоящей заявке.

[467] химерная конструкция 13 носителя (SEQ ID NO: 146) содержит домен I Cholix, полученный из последовательности SEQ ID NO: 1 (аминокислотные остатки 1-265 SEQ ID NO: 2), транслокационный домен II PE, полученный из последовательности SEQ ID NO: 138, домен Ib PE, полученный из последовательности SEQ ID NO: 139, и нетоксичный каталитический домен III PE, полученный из последовательности SEQ ID NO: 140. химерная конструкция 14 носителя (SEQ ID NO: 147) содержит домен I PE, полученный из последовательности SEQ ID NO: 137, транслокационный домен II носителя Cholix, полученный из последовательности SEQ ID NO: 126, домен Ib носителя Cholix, полученный из последовательности SEQ ID NO: 127, и нетоксичный каталитический домен III носителя Cholix, полученный из последовательности SEQ ID NO: 128.

[468] Как показано на **фиг. 4** (через 1 минут, **фиг.4A** - фиг. **4E**) и **на фиг. 5** (через 20 минут, **фиг.5A** - фиг. **5E**) для конструкции 13 и **на фиг. 6** (через 1 минуту, **фиг.6A** - фиг. **6E**) и **на фиг. 7** (через 20 минут, **фиг.7A** - фиг. **7E**) для конструкции 14, химерные конструкции носителя способны к транспортировке через тощую кишку крысы и клетки-мишены в собственной пластинке in vivo. Таким образом, в настоящей заявке показано, что химерные конструкции доставки, содержащие части или домены из двух или более разных экзотоксинов (например, Cholix и PE) также могут эффективно доставлять груз в эпителиальные клетки и через них.

ПРИМЕР 6

Получение и Первые Исследования Транспортировки In vivo Конструкций доставки усеченного домена I Cholix

[469] В этом примере показана функция трансцитоза усеченных полипептидов носителей, полученных из Cholix, причем, важно, что усечение происходит в различных местах в домене I экзотоксина Cholix.

[470] Нерасщепляемый полиглицин-сериновый пептидный спейсер GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210) использовали для соединения гормона роста человека (HGH) (SEQ ID NO: 214) с С-концом различных модифицированных полипептидов носителей Cholix для получения следующей конструкции доставки для оценки согласно методике получения белка, описанной в примере **1** выше (в данном случае получено бактериальным путем): 1) SEQ ID NO: 160, которая содержит модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 187 SEQ ID NO: 5; 2) SEQ ID NO: 159, которая содержит модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 151 SEQ ID NO: 5; 3) SEQ ID NO: 158, которая содержит модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 134 SEQ ID NO: 5; 4) SEQ ID NO: 161, которая содержит модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 206 SEQ ID NO: 5; 5) SEQ ID NO: 162, которая содержит модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 245 SEQ ID NO: 5; 6) SEQ ID NO: 163, которая содержит модифицированный носитель Cholix, усеченный по аминокислотному остатку 251 SEQ ID NO: 5; и 8) SEQ ID NO: 165, которая содержит модифицированный носитель Cholix, содержащий аминокислотные остатки 40-187 SEQ ID NO: 5.

[471] Чтобы проанализировать полученные белки слияния, конструкции вводили в просвет тонкой кишки крыс, и место инъекции собирали через 5, 10 или 15 минут после инъекции. Ткань фиксировали и делали срезы, затем окрашивали антителами против Cholix и против HGH. Флуоресцентные вторичные антитела использовали для визуализации расположения белка с помощью конфокальной микроскопии. Как показано на фиг. 8А-ФИГ. 8С, конструкцию, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 165, визуализировали в эпителиальных клетках, и через 5, 10 и 15 минут она ограничена областью около мембраны на апикальной стороне клеток. Не было значительного перемещения белка через клетки из этого компартмента, и белок не появлялся в собственной пластинке. Это позволяет предположить, что полипептида-носителя с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 165 достаточно для захвата эпителиальными клетками, например, через его сайт связывания с рецептором и/или посредством взаимодействия с TMEM132 и/или LRP1, но в нем отсутствует часть последовательность трансцитоза, что приводит к накоплению в эпителиальных клетках. Для сравнения было показано, что конструкции, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 161 - SEQ ID NO: 164, быстро перемещаются по эпителиальным клеткам после захвата и транспортируются из клеток в собственную пластинку. Как показано на фиг. 9, конструкция, полученная из Cholix с SEQ ID NO: 160,

также была визуализирована в апикальном компартменте эпителиальных клеток через 5 минут. Через 10 и 15 минут небольшие количества белка переместились на базальную сторону клетки, но не появились в собственной пластинке.

[472] Это позволяет предположить, что N-конец может участвовать в пути транспортировки, но этого недостаточно для полного трансцитоза через клетку. Неожиданные открытия, изображенные на фиг. 8А-ФИГ. 8С и фиг. 9, представляют собой потенциальный способ специальной доставки груза, прикрепленного к этим усечениям, в эпителиальные клетки, поскольку они захватываются клетками, но не могут транспортироваться наружу и, таким образом, накапливаться внутри.

ПРИМЕР 7

Апикально-базальный Трансцитоз In vitro Конструкции нетоксичного полноразмерного Cholix

[473] В этом примере показан апикально-базолатеральный трансцитоз модифицированного, нетоксичного Cholix (ntChx) через поляризованные эпителиальные клетки кишечника in vitro.

[474] В этом примере конструкция Cholix была сделана нетоксичной за счет аминокислотного изменения специфического остатка глутаминовой кислоты (замещенного аланином) в ферментативном кармане для ADP-рибозилирования, что привело к замене E581A и полипептиду с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3 (ntChx).

[475] Транспортировку нетоксичного E581A Cholix (ntChx) при 37°C измеряли через сливные слои (площадь поверхности фильтра 0,6 $см^2$) первичного эпителия кишечника человека in vitro с концентрациями 2,5-200 мкг/мл, применяемыми на апикальной поверхности, и количество ntChx в базальном компартменте через 2 часа измеряли с помощью ELISA (фиг. 10А). Испытанный диапазон концентраций продемонстрировал очевидную проницаемость для апикальных концентраций ntChx 2,5-20 мкг/мл, что примерно в 2 раза больше, чем для апикальных концентраций выше 20 мкг/мл, хотя все концентрации продемонстрировали значительную эффективность транспортировки этого белка с массой ~ 70 кДа. Разрыв в показателях проницаемости может соответствовать опосредованному рецептором механизму транспортировки, который насыщается при ~ 20 мкг/мл для систем с площадью поверхности фильтра 0,6 $см^2$ первичного эпителия кишечника человека, используемых для этого исследования in vitro. Важно отметить, что видимый размер транспортированного ntChx, по-видимому, не был существенно изменен (например, химически модифицирован) при оценке с помощью Вестерн-блоттинга (фиг. 10В).

[476] Оценка трансцитоза ntChx в динамике при концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл продемонстрировала, что трансцитоз ntChx начал достигать линейности после приблизительно 20-25-минутной фазы задержки (фиг. 10С). Используя эти значения транспортировки, рассчитали проницаемость для ntChx при 37°C через первичный эпителий кишечника человека in vitro, которая составила ~ $1,92\times10^{-5}$ см/сек. Эта скорость

проницаемости снижалась, когда тот же протокол транспортировки in vitro выполняли при 4°C (фиг. 10C). Можно предположить, что при количествах ntChx, примененных апикально, апикальная концентрация ntChx в этой модели in vitro начинает истощаться через ~ 90 мин. Вместе эти данные подтверждают, что ntChx транспортируется посредством энергоемкого, высокоэффективного, опосредованного рецепторами процесса трансцитоза. Такой процесс может зависеть от количества ntChx, способного взаимодействовать с рецепторами апикальной поверхности (например, белком 1, связанным с рецептором липопротеинов низкой плотности (LRP1)), вовлеченным в эндоцитоз, который приводит к доступу к пути трансцитоза, который остается в привилегированном положении от значительного катаболизма.

[477] pH поверхности апикальной мембраны эпителия тонкого кишечника может составлять от 5 до 7 (17). Трансцитоз через первичный эпителий кишечника человека, проверенный in vitro для 20 мкг/мл и исследованный через 120 мин, был примерно в два раза эффективнее, когда апикальная среда была pH 7 по сравнению с pH 5, тогда как базальный pH 7 или 5 казалось не оказывает эффекта (фиг. 11).

[478] Не связывая себя какой-либо теорией, было сделано предположение, что большая вариабельность, наблюдаемая для исходов, когда при транспортировке ntChx тестировали апикальный pH 5, могла быть связана с усилиями эпителия нейтрализовать этот апикальный компартмент во время исследования, что может происходить только на апикальной плазматической мембране в непосредственной близости от места опосредованного рецепторами эндоцитоза ntChx. В сумме эти данные предполагают, что ntChx, как раскрыто в настоящем документе, может быть способен к эффективной, последовательной и непрерывной транспортировке через эпителий кишечника человека посредством опосредованного рецепторами процесса, который не может привести к значительной модификации размера транспортируемого белка.

ПРИМЕР 8

Анализ Пути Трансцитоза Полноразмерной Конструкции Нетоксичного Cholix

[479] В этом примере показан апикально-базолатеральный трансцитоз ntChx (SEQ ID NO: 3) через поляризованные эпителиальные клетки кишечника in vivo при исследовании способности транспортировки ntChx через эпителий кишечника in vivo путем прямой внутрипросветной инъекции (ILI) в тощую кишку крысы.

[480] Иммунофлуоресцентные изображения под микроскопом показали, что ntChx, идентифицированный с использованием поликлональной антисыворотки против Cholix, быстро проникает в эпителиальные клетки и перемещается через эти эпителиальные клетки в везикулоподобные структуры, которые включают совместные локализации клатерина, при этом процесс трансцитоза завершается в течение нескольких минут. (ФИГ. 12A-ФИГ. 12C). Зависящие от времени изменения в расположении везикулоподобных структур, положительных по ntChx, продемонстрировали его распределение в компартментах, расположенных выше и ниже ядра энтероцита, а также внутри выбранной

популяции клеток в собственной пластинке. Трансцитоз ntChx, по-видимому, также происходит через бокаловидные клетки. Транспортировка ntChx между соседними эпителиальными клетками, так называемый параклеточный путь, в этом эксперименте не наблюдалась.

[481] Оказалось, что ILI ntChx в тонкую кишку крысы ограничивает воздействие на верхние сегменты и кончик ворсинок кишечника.

ПРИМЕР 9

Трансцитоз Конструкций Нетоксичного Cholix Включает Специфические Везикулярные Компартменты

[482] В этом примере показан апикально-базолатеральный трансцитоз ntChx (SEQ ID NO: 3), который включает доступ в конкретные везикулярные компартменты (например, фиг. 13A-фиг. 13F).

[483] Трансцитоз ntChx может включать процессы эндоцитоза, опосредованные рецепторами, и последующую везикулярную миграцию, которая позволяет избежать типичной судьбы лигандов, интернализированных этим путем лизосомной деградации. Ряд облигатных и стимулирующих внутриклеточных патогенов способны разрушать эндоцитические и секреторные пути клеток-хозяев, которые ограничивают их воздействие на лизосомы через эффекторные белки, обеспечивающие или манипулирующие процессами в клетках-хозяевах. В этом примере изучали ntChx-содержащие везикулы, претерпевающие трансцитоз, для определения идентичности ассоциированных белков, которые могут определять элементы миграции и клеточные компартменты, которые могут участвовать в трансцитозе вариантов Chx и Chx, как раскрыто в настоящей заявке.

[484] При захвате апикальной плазматической мембраной наблюдали, что ntChx-положительные везикулы совместно локализуются с Ras-родственным белком Rab 5 и антигеном 1 ранних эндосом (EEA1) (фиг. 13A), демонстрируя признаки ранней эндосомы/сортирующей эндосомы (EE/SE), предполагая, что этот экзотоксин может проникать в эпителиальные клетки кишечника через рецептор-опосредованный эндоцитоз. Популяции EEA1-положительных везикул также наблюдались в базальном компартменте энтероцитов, но они в меньшей степени были связаны с присутствием ntChx (фиг. 13A). Связанный с Ras белок Rab 11a, который, как известно, связан с рециклингом эндосом, наблюдали как в апикальном, так и в базальном компартментах энтероцитов, но совместная локализация Rab 11a с везикулами, содержащими ntChx, наблюдалась преимущественно в базальном компартменте (фиг. 13B). Более того, можно считать, что сеть транс-Гольджи (TGN) функционирует в качестве пункта сортировки секреторных путей, направляя вновь синтезированные белки в различные клеточные компартменты, при этом TGN-38 идентифицируется как указывающий. Примечательно, что в этом эксперименте не наблюдалось совместной локализации ntChx с TGN-38 в энтероцитах, но совместная локализация после трансцитоза в неполяризованных клетках с собственной пластинкой (фиг. 13C). Кальнексин представляет собой лектиновый шаперон, расположенный в эндоплазматическом ретикулуме (ER), который может

участвовать в регулировании концентрации свободного цитозольного Ca^{2+}. Было обнаружено, что во время трансцитоза ntChx может совместно локализоваться с калнексином, прежде всего, в апикальном компартменте энтероцитов, но с распределениями, которые включают базальный компартмент (фиг. 13D). Кроме того, наблюдалась совместная локализация Ras-родственного белка Rab 7, маркера поздних эндосом и везикул, переносимых в лизосомы, как в апикальной, так и в базальной частях энтероцитов с ntChx (фиг. 13E). Наблюдалась похожая совместная локализация LAMP1 (ассоциированного с лизосомами мембранного белка 1), распределенного как в поздних эндосомах, так и в лизосомах, с ntChx как в апикальной, так и в базальной частях энтероцитов, но он, по-видимому, не локализуется совместно с более крупными везикулярными структурами, которые соответствовали по размеру и количеству лизосомным структурам (фиг. 13F).

[485] Апикальное применение ntChx-NP привело к процессу трансцитоза, согласующемуся с тем, что наблюдали для одного ntChx, и без совместной локализации с LAMP1-положительными структурами (фиг. 13F). После прохождения через слой эпителиальных клеток кишечника ntChx-NP наблюдали в LAMP1-положительных структурах внутри клеток, присутствующих в собственной пластинке (фиг. **13C**).

ПРИМЕР 10

Сравнение Функции Трансцитоза Нетоксичного Полноразмерного Экзотоксина Cholix по сравнению с одним доменом I Cholix

[486] В этом примере показана in vivo транспортировка белков усеченного носителя домена I Cholix (например, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 4), как описано в примере **6,** по сравнению с нетоксичным полноразмерным Cholix, который описан в примере **7**.

[487] Трансцитоз ntChx (SEQ ID NO: 3) in vitro контролировали с помощью вестерн-блоттинга и иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием поликлональных антител, индуцированных против полноразмерного белка. Чтобы проверить, может ли это поликлональное антитело обеспечить эквивалентное покрытие ntChx во всех областях с целью обнаружения усеченных форм экзотоксина, исследовали способность усеченной формы Cholix переносить белковый груз, который можно использовать для оценки эквивалентности трансцитоза.

[488] Были получены генетические химеры полноразмерного белка (ntChx) и варианты белка, состоящего только из домена I, содержащего аминокислотную последовательность SEQ NO: 5, и его C-конец использовали для конъюгирования красного флуоресцентного белка (RFP, SEQ ID NO: 220) через его N-конец, в результате чего получается конструкция, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 157). Только RFP, имеющий молекулярную массу 25,9 кДа (225 аминокислотных остатков), использовали в качестве контроля трансцитоза.

[489] Данные показывают, что степень трансцитоза одного RFP была минимальной по сравнению со степенью трансцитоза ntChx-RFP и домена I Cholix ($M+Cholix^{1-265}$ или

остатки 1-266 SEQ ID NO: 5)-RFP (SEQ ID NO : 156) при исследовании через 30 мин после ILI в тощую кишку крысы in vivo (фиг. 14A). Картины эпителиального трансцитоза были сходными, и степень RFP, обнаруживаемого в собственной пластинке, также была сопоставима как для ntChx-RFP (фиг. 14B), так и для домена Cholix I-RFP (фиг. 14C) (стрелки на этих фигурах показывают апикальную сторону эпителия). Эти результаты предполагают, что элементы Cholix, участвующие в трансцитозе, находятся в домене I, и что этого домена может быть достаточно для переноса белкового груза через эпителий кишечника, заменяя домены II и III Cholix.

ПРИМЕР 11

Трансцитоз in vitro и функция внутриклеточной доставки Белков-Носителей Домена I усеченного Cholix

[490] В этом примере показан апикально-базолатеральный трансцитоз in vitro и функции внутриклеточной доставки различных белков-носителей усеченного домена I Cholix, конъюгированных с гормоном роста человека посредством спейсера, который описан выше в примере **6**.

[491] Для дальнейшего изучения функции элементов в домене Cholix I, участвующих в трансцитозе, получили в виде генетических конструкций серию химер, содержащих фармацевтически значимый белок, гормон роста человека (HGH, SEQ ID NO: 214). Каждая усеченная последовательность домена I Cholix (SEQ ID NO: 5, бактериально экспрессированная) была конъюгирована через C-конец с N-концом HGH через спейсерную последовательность $G_4SG_4SG_4S$ (SEQ ID NO: 210), в результате чего химеры имели аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 163 и SEQ ID NO: 164. В случае усечения K187 домена I Cholix с помощью SEQ ID NO: 5, первые 39 аминокислот также были удалены с образованием фрагмента E40-K187 домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) с получением конструкции с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 165 (**ТАБЛИЦА 14**).

ТАБЛИЦА 14 - Конструкции доставки усеченного домена I Cholix для HGH

SEQ ID NO	**Обозначение (относительно SEQ ID NO: 4)**	**Мол. Масса**	**Ca**
SEQ ID NO: 158	M+Cholix$^{1-133}$-HGH	38,0	4,70
SEQ ID NO: 159	M+Cholix$^{1-150}$-HGH	40,0	4,69
SEQ ID NO: 160	M+Cholix$^{1-186}$-HGH	44,2	4,76
SEQ ID NO: 161	M+Cholix$^{1-205}$-HGH	46,4	5,04
SEQ ID NO: 162	M+Cholix$^{1-244}$-HGH	50,7	4,96
SEQ ID NO: 163	M+Cholix$^{1-250}$-HGH	51,4	5,01
SEQ ID NO: 164	M+Cholix$^{1-265}$-HGH	53,1	5,12
SEQ ID NO: 165	Chx$^{39-186}$-HGH	40,0	4,91

[492] Эксперименты по изучению возможностей транспортировки этих химер через монослои эпителия кишечника человека in vitro продемонстрировали, что конструкции доставки с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 160 и SEQ ID NO: 165 не транспортируются в отличие от SEQ ID NO: 161, как показано на фиг. 15A. Несмотря на его гораздо более низкую молекулярную массу, только HGH транспортируется в меньшей степени по сравнению с SEQ ID NO: 164 (фиг. 15A, правая часть показывает присутствие в базальном компартменте). Трансцитоз SEQ ID NO: 161 и SEQ ID NO: 162 был сравним с трансцитозом SEQ ID NO: 164 в 2-часовой временной точке оценки в этой модели тонкого кишечника человека in vitro (фиг. 15B). Неожиданно конструкция доставки с аминокислотой SEQ ID NO: 161 была лучше по своей транспортной способности по сравнению с SEQ ID NO: 164, что демонстрирует более высокий относительный сигнал SEQ ID NO: 161 по сравнению с SEQ ID NO: 164.

[493] Эти результаты предполагают, что домена I Cholix достаточно для апикально-базального транспорта и что он может функционировать в качестве элемента трансцитоза для доставки различных гетерологичных грузов через эпителиальные клетки, причем гетерологичный груз может заменять домены II, Ib и III экзотоксина Cholix. Кроме того, было продемонстрировано, что элементов в первых 206 аминокислотных остатках бактериально экспрессируемого белка Cholix (например, SEQ ID NO: 5 или, альтернативно, первых 205 аминокислотных остатков SEQ ID NO: 4) может быть достаточно для функции трансцитоза и, таким образом, их можно использовать в качестве эффективного носителя для различных гетерологичных грузов. Примечательно, что результаты предполагают, что эффективность трансцитоза этих первых 206 аминокислот SEQ ID NO: 5 может быть даже больше, чем эффективность всего домена I (например, SEQ ID NO: 5) или полноразмерного зрелого экзотоксина Cholix (например, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2). Таким образом, описанные в настоящей заявке конструкции усеченного домена Cholix I можно использовать для эффективного перемещения молекул гетерологичных грузов, таких как терапевтические и/или диагностические средства, через слой эпителиальных клеток (например, эпителий кишечника), позволяя пероральное введение терапевтических и/или диагностических средств (например, более крупных полипептидов или белков, таких как антитела), которые в противном случае вводят парентерально (например, внутривенно или подкожно). Кроме того, эти результаты показывают, что усеченные варианты домена I Cholix можно использовать для доставки различных гетерологичных грузов в эпителиальные клетки с использованием конструкций доставки, которые описаны в настоящей заявке.

ПРИМЕР 12

Трансцитоз in vivo и Функция Внутриклеточной Доставки Белков-Носителей Усеченного Домена I Cholix

[494] В этом примере показана транспортировка in vivo усеченных белковых химер домена I Cholix (например, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5), через эпителиальные клетки кишечника для доставки гетерологичного груза (в этом примере: гормона роста человека).

[495] Выбранные усеченные химеры, как показано выше в таблице **14** примера **11,** исследовали на их способность к трансцитозу in vivo после ILI в тощую кишку крысы. Обозначения, указывающие длину и остаток, в котором происходило усечение носителей усеченного домена I Cholix, относятся к SEQ ID NO: 5

[496] Данные, полученные в этих исследованиях, показывают, что хотя M+Cholix$^{1-133}$-(SEQ ID NO: 10)-HGH (SEQ ID NO: 158) не проникал в эпителий крысы через 15 минут (фиг. **16A**), M+Cholix$^{1-150}$-(SEQ ID NO: 10)-HGH (SEQ ID NO: 159) претерпел эндоцитоз, но не завершил трансцитоз, о чем свидетельствует отсутствие этой химеры в собственной пластинке (фиг. 16B). Конструкция с SEQ ID NO: 159 удерживалась в везикулярном пуле, ограниченном компартментами около апикальной и базальной плазматических мембран энтероцитов (фиг. 16B). Усеченный мутант M+Cholix$^{1-186}$-(SEQ ID NO: 10)-HGH (SEQ ID NO: 160) привел к аналогичным результатам, которые наблюдались для конструкции с SEQ ID NO: 159, с тем отличием, что конструкция с SEQ ID NO: 160, по-видимому, получает доступ к супрануклеарному везикулярному компартменту, к которому не имеет доступа конструкция с SEQ ID NO: 159 (фиг. 16C). Кроме того, удаление первых 39 аминокислот домена I Cholix с SEQ ID NO: 5 (приводящее к конструкции M+Cholix$^{39-186}$-(SEQ ID NO: 210)-HGH, SEQ ID NO: 165) привело к белку, который мог подвергаться эндоцитозу, но не мигрировал из апикального везикулярного компартмента в базальный везикулярный компартмент энтероцита через 15 мин после ILI (фиг. **16D**).

[497] Эти результаты предполагают, что элементы домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) между E134 и D151 важны для апикального эндоцитоза, что элементы в пределах первых 39 аминокислот домена I Cholix могут иметь решающее значение для миграции из апикального везикулярного пула в базальный везикулярный пул, и что элементы между K187 и K206 могут иметь решающее значение для секреции Cholix с базолатеральной поверхности энтероцитов. Таким образом, эти результаты демонстрируют, что домен I Cholix и его усеченный вариант, например, те, что содержат первые 206 аминокислотных остатков домена I Cholix (SEQ ID NO: 5), могут эффективно доставлять различные грузы через эпителиальные клетки (например, через поляризованные эпителиальные клетки кишечника субъекта). Кроме того, эти результаты показывают, что усеченные варианты домена I Cholix можно использовать для доставки различных гетерологичных грузов в эпителиальные клетки с использованием конструкций доставки, которые описаны в настоящей заявке.

ПРИМЕР 13

Оценка Функциональных пептидных фрагментов домена I Cholix

[498] В этом примере показано повторение трансцитоза домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) с использованием функциональных элементов, например, функциональных пептидных фрагментов, домена I Cholix для создания синтетического полипептида, который можно доставлять в эпителиальные клетки и/или через слой эпителиальных клеток (например, монослой эпителиальных клеток и/или эпителий кишечника субъекта) in vitro (фиг. **17A**) и in vivo (фиг. **17B**). Кроме того, **на фиг. 18**, например, представлены

некоторые функциональные аминокислотные последовательности в домене I Cholix в виде окрашенных фрагментов последовательности. Кроме того, **на фиг. 20** представлен общие трехмерные структуры домена I Cholix с выделенными функциональными фрагментами SEQ ID NO: 148 (фиг. **20A**), SEQ ID NO: 151 (фиг. **20B**) и SEQ ID NO: 152 (фиг. **20C**). Все аминокислотные остатки и их позиции показаны относительно бактериально экспрессируемой последовательности домена I Cholix SEQ ID NO: 5.

[499] С этой целью эксперименты по трансцитозу с использованием конкретных пептидов, полученных из частей домена I Cholix (SEQ ID NO: 5), которые были определены как критические для апикального эндоцитоза, были использованы для моделирования различных стадий и аспектов, таких как внутриклеточная миграция и базальная мембранная секреция при трансцитозе полноразмерного ntChx, иллюстративные пептидные фрагменты домена Cholix показаны ниже в таблице 15 (включая молекулярную массу и изоэлектрическую точку (pI)).

ТАБЛИЦА 15 - Идентифицированные иллюстративные Функциональные Пептидные Домены В аминокислотной последовательности домена I Cholix (SEQ ID NO: 5)

SEQ ID NO	**Пептидная последовательность**	**Обозначение**	**Мол. Масса (Да)**	**pI**
SEQ ID NO: 148	$_{134}$ELDQQRNIIEVPKLYSID$_{151}$	Эндоцитоз (E)	2173,5	4,32
SEQ ID NO: 149	$_{1}$MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD$_{39}$	Апикально-Базальная (T)	4258,9	4,20
SEQ ID NO: 151	$_{151}$DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK$_{187}$	Супрануклеарный (N)	4276,7	5,48
SEQ ID NO: 152	$_{187}$KAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL$_{206}$	Базальное высвобождение (R)	2568,9	11,1

[500] Например, пептид $_{134}$ELDQQRNIIEVPKLYSID$_{151}$ (SEQ ID NO: 148) был элементом, который отличается от M+Cholix$^{1-150}$-HGH (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 159) и M+Cholix$^{1-133}$-HGH (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 158), одной химеры, которая может подвергаться эндоцитозу, и другой которая не может. Другой представляющий интерес пептид находится в первых 39 аминокислотах ($_{1}$MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLD$_{39}$, SEQ ID NO: 149), которые отсутствовали в конструкции M+Cholix$^{39-186}$ (SEQ ID NO: 165), у которой отсутствовала

способность мигрировать из апикальной части эпителиальной клетки в базальный домен после эндоцитоза. Пептидом, который обеспечивает различие от M+Cholix$^{1-150}$-(SEQ ID NO: 210)-HGH и M+Cholix$^{1-186}$-(SEQ ID NO: 210)-HGH, был $_{151}$DLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYK$_{187}$ (SEQ ID NO: 151); M+Cholix$^{1-150}$-(SEQ ID NO: 210)-HGH показал способность к доступу в супрануклеарную область клетки, которая была недоступна для M+Cholix$^{1-150}$-(SEQ ID NO: 210)-HGH. Наконец, M+Cholix$^{1-265}$-(SEQ ID NO: 210)-HGH секретировался с базальной поверхности эпителиальных клеток кишечника, тогда как M+Cholix$^{1-186}$-(SEQ ID NO: 210)-HGH - нет; $_{187}$KAAQKEGSRHKRWAHWHTGLAL$_{206}$ (SEQ ID NO: 152) представляет собой пептид, который описывает различие в последовательностях двух этих химер (см. Например, фиг. **17A**).

[501] Полимерный каркас, содержащий пептидные последовательности аминокислот из позиций 1-39, 134-151, 151-178 и 178-206 домена I Cholix с SEQ ID NO: 5 в различных комбинациях, метили квантовыми точками разной формы.

[502] Данные in vitro показывают, что некоторых выбранных пептидных последовательностей пептидных элементов домена I Cholix достаточно для обеспечения апикального или базального трансцитоза in vitro и in vivo (фиг. 17). Например, трансцитоз через поляризованный эпителий кишечника измеряли in vitro через 2 часа, как показано на фиг. 17A. Количество транспортируемого материала выражено в виде кратного увеличения флуоресценции по сравнению с препаратом с полимер-квантовой точкой, в котором отсутствуют какие-либо пептиды Chx. (N=2; среднее ± S.E) (фиг. 17A). Затем проводили измерение трансцитоза in vivo препаратов полимера-квантовых точек через 15 мин после мечения квантовыми точками (фиг. 17B и фиг. 17C).

[503] Данные показывают, что различные варианты последовательности Cholix, описанные в настоящем документе, сохраняют эффективный эндоцитоз после поглощения из просвета, но не обладают способностью к завершению трансцитоза, что позволяет нацеливать на апикальные или апикальные и базальные везикулярные структуры. Из представленных данных следует, что Cholix использует процесс эндоцитоза рецепторного типа, который включает аминокислоты 134-151, что обеспечивает доступ к везикулярному компартменту ранних эндосом в апикальной части энтероцитов (например, эпителиальных клетках кишечника). Аминокислоты 151-187 экзотоксинового домена I Cholix (например, SEQ ID NO: 5), как описано в настоящей заявке, по-видимому, обеспечивают его перемещение в супрануклеарный компартмент, соответствующий сайту сортировки в клетке для секреторных событий, и, таким образом, обеспечивают доставку различных грузов в эти места. Движение к базальному компартменту клеток становится более эффективным при наличии аминокислот 1-40. Наконец, аминокислоты 187-206 обеспечивают механизм секреции из базальной мембраны, который высвобождает весь интактный белок в собственную пластинку, где он может обеспечивать терапевтически эффективные концентрации терапевтических грузовых молекул (например, интерлейкинов), представляющих антигены иммунным клеткам, и/или обеспечивать

попадание груза в системный кровоток для доставки к другим органам/тканям-мишеням у субъекта.

ПРИМЕР 14

Совместная локализация Конструкций доставки из домена I Cholix с Различными Маркерными Белками Демонстрирует Миграцию С использованием Разных Компартментов

[504] В этом примере показано, что конструкции доставки, полученные из домена I Cholix, используют разные компартменты для миграции в эпителиальные клетки и через них (например, посредством трансцитоза) с использованием различных маркерных белков (см. Например, **ПРИМЕР 3**), что означает, что конструкции носителей, полученных из Cholix, используют специфические и эндогенные пути миграции. Описанное в этом примере исследование проводили с использованием конструкции доставки, полученной из Cholix, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154 (содержащей носитель M+Cholix^{386}, соединенный с IL-10 посредством спейсера, с последовательностью SEQ ID NO: 210, M=N-концевой метионин).

[505] **Антиген EEA1. На фиг. 21A** показано, что конструкции доставки Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154) в значительной степени совместно локализованы с антигеном EEA1 в местах клетки, согласующихся с миграцией как в апикальном, так и в базальном доменах энтероцитов, что позволяет предположить наличие полученных из Cholix конструкций доставки в компартментах ранних эндосом.

[506] **Rab7. Кроме того**, показано, что конструкции доставки Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154, сверху справа) в значительной степени совместно локализованы с Rab7 (сверху слева) преимущественно в апикальном компартменте энтероцитов, но только с ограниченной совместной локализацией в клетках в собственной пластинке, что позволяет предположить наличие полученных из Cholix конструкций доставки в компартментах поздних эндосом (фиг. **21B**, снизу слева представлено изображение в белом свете, а снизу справа представлено объединенное окрашивание DAPI).

[507] **LAMP1.** LAMP1 идентифицирован в больших специфических везикулах, соответствующих зрелым лизосомам, которые лишены конструкции доставки Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154, белые стрелки). Однако химера Cholix-IL-10 также совместно локализована с антигеном LAMP1 в местах клетки, отличающихся от лизосомоподобных структур, соответствующих миграции везикул как в апикальном, так и в базальном доменах энтероцитов, что позволяет предположить наличие полученных из Cholix конструкций доставки в лизосомных компартментах (фиг. **21C**).

[508] **Клатрин.** Кроме того, химера Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154) также в значительной степени совместно локализована с покрытыми клатрином везикулами, в частности в зонах рядом с ядром и с Rab 1 преимущественно в базальном компартменте энтероцитов, а также в выбранных клетках в собственной пластинке (фиг. **21D**).

[509] **Калнексин.** химера Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154) совместно локализована с эндоплазматическим ретикулумом, что показывает калнексин в профиле рядом с ядром в

энтероцитах и в большей части клеток в собственной пластинке (фиг. **21E**).

[510] **Промежуточный компартмент Гольджи эндоплазматического ретикулума.** химера Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154) в значительной степени совместно локализована с промежуточным компартментом Гольджи эндоплазматического ретикулума (ERGIC) и антигеном LAMN1, по-видимому, для перераспределения в ответ на эндоцитоз и трансцитоз носителя, как показано через 1 (фиг. **21F**), 5 (фиг. **21G**), 10 (фиг. **21H**) и через 15 минут после инъекции (фиг. **21I**). Трансцитоз конструкции доставки продемонстрировал постоянную миграцию в больших количествах через энтероциты. Конкретные компартменты, в которых была значительная совместная локализация при этом трансцитозе, включали компартменты ранних эндосом и поздних эндосом. Носитель, полученный из Cholix, по-видимому, связан с покрытыми клатрином везикулами поблизости от ER-сеть Гольджи, организованной рядом с ядрами энтероцитов. Совместная локализация носителя, полученного из Cholix, наблюдалась с ER и ERGIC, также описано как LMAN1 (маннозосвязывающий лектин 1), но ограничена его связь с элементами сети цис-Golgi, Golgi и транс-Гольджи. Носитель, полученный из Cholix, совместно локализован с рециркулирующими эндосомами около базальной поверхности энтероцитов таким образом, чтобы его можно было скоординировать с перераспределением ERGIC. ERGIC-53 может также функционировать в качестве рецептора внутриклеточного груза, участвующего в антероградной транспортировке ограниченного количества гликопротеиновых лигандов на раннем пути экзоцитоза, и используется рядом РНК-вирусов как часть их стратегии экзоцитоза. Исследования связывания на основе ELISA продемонстрировали, что Cholix и полученные из Cholix конструкции доставки могут связываться с ERGIC-53 при pH 7,4, но это взаимодействие значительно сильнее при pH 5,5. Исследования SPR дополнительно подтвердили это pH-зависимое взаимодействие (фиг. **31**).

[511] **Гиантин.** химера Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154) не локализовалась совместно с низкими уровнями гигантина, присутствующими в энтероцитах (фиг. 21J). Некоторая часть гигантина совместно локализуется с химерой в подгруппе клеток, присутствующих в собственной пластинке, что позволяет предположить, что носитель, полученный из Cholix, не локализован в компартменте Гольджи.

[512] **Антиген 58K.** Антиген 58K. Антиген 58K, локализованный в энтероцитах на участке, апикальном по отношению к ядру, и химера Cholix-IL10 демонстрирует некоторую совместную локализацию с этим антигеном, что предполагает кратковременное перемещение через этот компартмент. Антиген 58K не наблюдался в клетках в собственной пластинке (фиг. **21K**).

[513] **Антиген TGN38.** химера Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154) показала некоторый уровень совместной локализации с антигеном TGN38 (сверху справа), который показал клеточное распределение, ограниченное апикальной стороной ядер в энтероцитах и рядом с ядром в нескольких клетках в собственной пластинке (фиг. **21L**, изображение в белом свете и объединенное изображение показаны снизу слева и снизу справа, соответственно).

[514] **Rab 1.** химера Cholix-IL-10 (SEQ ID NO: 154, сверху справа) в значительной степени совместно локализована с Rab 1 (сверху слева) преимущественно в базальном компартменте энтероцитов и в выбранных клетках в собственной пластинке (фиг. **21M**, изображение в белом свете и объединенное изображение показаны снизу слева и снизу справа, соответственно).

[515] Эти данные демонстрируют, что полученные из Cholix конструкции доставки согласно настоящему раскрытию взаимодействуют с различными эндогенными белками и рецепторами, чтобы задействовать эндогенную систему транспортировки для эффективной доставки груза через и/или в эпителиальные клетки (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника).

ПРИМЕР 15

Общий Протокол Оценки Рецепторов Взаимодействия с Экзотоксином Cholix

[516] На основе результатов, показанных выше в примере **14**, в этом примере показан протокол оценки рецепторов взаимодействия с Cholix и разная дополнительная информация, касающаяся этого взаимодействия. Различные полученные из Cholix конструкции доставки, включая те, что имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154 (M+Cholix^{386}-GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210)-IL-10), и конструкцию, содержащую домен I Cholix SEQ ID NO: 5, соединенный с IL-10 (SEQ ID NO: 217) или HGH (SEQ ID NO: 153) посредством спейсера GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210), использовали в этом исследовании, например, SEQ ID NO: 164. Сначала ограниченный набор белков-кандидатов в качестве рецепторов белков-носителей идентифицировали с помощью исследований методом захвата шариков и анализа масс-спектрометрии. Затем, оценили in vitro взаимодействие носителя Cholix с этими белками-кандидатами (например, с использованием монослоев клеток Caco-2) и in vivo (например, в тощей кишке крысы).

[517] Обычно, наноразмерные магнитные шарики (диаметром 25 нМ или 100 нМ) снабжали нетоксичными элементами-носителями белка Cholix с использованием метода взаимодействия на основе биотина или полигистидина (например, с использованием 1D SDS-PAGE, описанного, например, на фиг. 22). Обеспечивали транспортировку этих обогащенных шариков через поляризованные монослои in vitro линий Caco2 клеток рака толстой кишки человека в течение заданных периодов времени до мягкого разрушения клеток и захвата везикул, содержащих эти магнитные шарики.

[518] После множества промывок, эти везикулы, обогащенные магнитными шариками, растворяли в буфере для лизиса, и присутствующие белковые компоненты выделяли с помощью 2-D SDS-PAGE (фиг. **23**). Профиль этих белков сравнивали с общим содержанием белков в этих клетках, а масс-спектрометрию использовали для идентификации конкретных элементов, связанных с везикулярными структурами, доступными для конструкции доставки, полученной из Cholix (фиг. **24**).

[519] Сравнение результатов повторов этого протокола использовали для идентификации ограниченного набора наиболее перспективных кандидатов, которые

затем исследовали на их содержание в клетках Caco-2 и в тонком кишечнике крысы (фиг. **25**). Впоследствии, взаимодействие Cholix с идентифицированными белками-кандидатами подтверждали с использованием покрытых носителем Cholix магнитных шариков и очищенного белка-кандидата. Инкубация покрытых носителем Cholix шариков с чистыми белками и последующие Western Blots или ELISA позволили обнаружить взаимодействие Cholix-белок, как иллюстративно показано на **фиг. 26**. На этой фигуре представлено взаимодействие носителя Cholix с гепарансульфат-протеогликаном (HSPG), Dickkopf-родственным белком 1 (DKK1), регулируемым глюкозой белком 75 шапероном (GRP75) и цитокератином-8 (K8 или CK8).

[520] Совместную локализацию белков-кандидатов и конструкции доставки, полученной из Cholix, оценивали под микроскопом в тощей кишке крысы in vivo. В данном случае совместная локализация конструкции доставки, содержащей белок-носитель Cholix, соединенный с IL-10 (SEQ ID NO: 154, M+Cholix^{386}-GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210)-IL-10) с CK8, показана in vivo после обработки тощей кишки крысы посредством введения в просвет конструкции, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154 через 1 минуту (фиг. **27A**), 5 минут (фиг. **27B**) и 10 минут (фиг. **27C**). Совместная локализация в супрануклеарной области повышалась с течением времени. Хотя трансцитоз конструкции доставки наблюдался в большинстве эпителиальных клеток, она взаимодействовала только отдельной популяцией клеток в собственной пластинке.

[521] Чтобы гарантировать, что распределение рецепторов было согласованным в исследованиях in vivo на крысах и в кишечнике человека, информацию сравнивали с исследованиями IHC, описанными в атласе человека. В данном случае были исследованы два рецептора, идентифицированные масс-спектрометрией и проверенные в тощей кишке крысы. На **фиг. 28A** и **ФИГ 28B** показано, что локализация GRP75 в кишечнике и HSPC совпадает для кишечника крысы и человека.

[522] Нокдаун в клетках Caco-2 с использованием метода sh-RNA использовали для создания стабильных клеточных линий которые использовали для проверки участия этих белков-мишеней в апикально-базальном трансцитозе белка-носителя Cholix. Затем эти исследования повторяли с использованием тощей кишки крысы in vivo для сравнения с результатами исследования клеток Caco-2 in vitro.

[523] В данном случае оценивали транспортировку конструкции доставки, полученной из домена I Cholix, в стабильных клетках Caco-2 с нокаутом HSPC посредством CRISPR. На **фиг. 29** представлено влияние нокаута HSPG посредством CRISPR на функцию транспортировки конструкции доставки (SEQ ID NO: 164), содержащей домен I Cholix, соединенный с HGH, и только HGH в качестве внутреннего контроля неселективной транспортировки. Клетки высевали в трансвеллах по $1{,}5\times10^5$ клеток/мл. На 18 день измеряли трансэпителиальное/трансэндотелиальное электрическое сопротивление (TEER), и в апикальные камеры добавляли PBS, содержащий 20 мкг/мл носителя с SEQ ID NO: 164. Через 3 ч базолатеральные образцы собирали и

концентрировали. Степень транспортировки белка анализировали с помощью Вестерн блоттинг с использованием антитела против HGH. Результаты, показанные на фиг. 29, демонстрируют, что трансцитоз и активная, селективная транспортировка белков-носителей, полученных из Cholix, зависит от HSPG, так как носитель Cholix показал значительно меньшую функцию трансцитоза в клетках с нокаутом HSPC по сравнению с нормальными клетками Caco-2, положительными по HSPG.

[524] Аналогичные исследования провели для дополнительных белков-кандидатов K8 (фиг. **30A**), HSPC (фиг. **30B**) и GRP75 (фиг. **30C**, контрольный цикл показан на **фиг. 30D**). Стабильные клеточные линии клеток Caco-2 с отсутствующей экспрессией конкретных белков-кандидатов использовали в качестве монослоев in vitro для проверки их потребности в трансцитозе носителей с использованием активных и селективных эндогенных механизмов транспортировки. Специфическая транспортировка конструкции доставки SEQ ID NO: 164 по сравнению с неселективной транспортировкой только HGH уменьшалась при нокауте HSPG и GRP75, но не при нокауте K8. Можно предположить, что HSPG и GRP75 нужны для активной транспортировки и трансцитоза белков-носителей, полученных из Cholix, и что K8 может не требоваться для активной транспортировки через эпителиальную клетку.

[525] Исследования ILI в тощую кишку крыс продемонстрировали, что GRP75 распределялся в энтероцитах в различных апикальных и базальных везикулярных популяциях; SEQ ID NO: 164 совместно локализовалась с GRP75 в везикулах в апикальной трети энтероцитов, не прилегающих непосредственно к апикальной плазматической мембране (Фиг. 3D). Конструкция, имеющая последовательность SEQ ID NO: 164 наблюдалась в этом апикальном GPR75-положительном компартменте, возникшем в течение 5 минут после нанесения в просвет и соответствовала раннему эндосомному компартменту. Позже наблюдали часть GPR75-положительных везикул, наблюдаемых около базальной мембраны, которые содержали конструкции с SEQ ID NO :. TMEM132A очень похож на связывающий белок GRP78 крысы. Не ограничиваясь какой-либо теорией, было сделано предположение, что сходство между GRP78 и GRP75 может дать рациональное объяснение взаимодействий TMEM132A с GRP75 и возможность их совместной локализации во время эндоцитоза Cholix.

[526] Эти данные демонстрируют, что, действительно, носитель, полученный из Cholix, и транспортировка и доставка груза являются активным и селективным процессом с участием различных рецепторов. Это может быть полезно для нацеленной доставки и терапевтических и/или диагностических молекул через и/или во внутреннюю часть эпителиальных клеток (например, эпителиальных клеток кишечника) для лечения и диагностики заболеваний, которые описаны в настоящей заявке.

ПРИМЕР 16

Оценка зависимости от pH Взаимодействия Носителя Cholix-GRP75

[527] В этом примере показана оценка зависимости от pH белка-носителя, полученного из Cholix (например, SEQ ID NO: 4), и одного из взаимодействующих с ним

во время активного трансцитоза рецепторов, GRP75.

[528] Для этого исследования связывающее взаимодействие Biacore использовали для изучения зависимости от pH взаимодействия носитель Cholix-GRP75. Белки-носители Cholix соединили с магнитными шариками с использованием биоконъюгации биотин-стрептавидин и инкубировали с очищенным белком GRP75 в буферных растворах с pH 5,5, 6,5 и 7,5, соответственно (фиг. **31**).

[529] Аффинность связывания при этих трех уровнях pH обычно была в низком наномолярном диапазоне, однако значительно более высокую (примерно в 20 раз выше) аффинность связывания носителя Cholix с GRP75 измерили при pH 6,5, что указывает на зависимость этого взаимодействия от pH.

ПРИМЕР 17

Оценка Типа и Места Партнеров по Взаимодействию с Доменом I Cholix

[530] В этом примере тип белков и их расположение в компартментах в эпителиальных клетках исследовали с использованием конструкции доставки, полученной из домена Cholix I (SEQ ID NO: 5), которая, как было показано, обладает такой же, если не большей, функцией трансцитоза, чем полноразмерный экзотоксин Cholix (SEQ ID NO: 1). Все аминокислотные остатки и их положения показаны относительно экспрессируемой бактериями последовательности домена I Cholix SEQ ID NO: 5.

[531] Партнеров по взаимодействию для домена I Cholix, оканчивающегося на K266 SEQ ID NO: 5, (бактериально экспрессируемый носитель Cholix содержит N-концевой метионин), захватывали с использованием магнитных шариков и процедуры выделения с последующей разделением с помощью разделения при 2-D гель-электрофорезе, и идентифицировали с использованием масс-спектрометрии, как описано выше в ПРИМЕРЕ 15. Важно отметить, что в этом примере также получали ряд усеченных форм полноразмерного экзотоксина Cholix для изучения различных аспектов этих взаимодействий: усечения по аминокислоте E134, D151, K187, L206, K245, или Q251, или L206, соединенной с N-концом гормона роста человека (HGH) через последовательность $G_4SG_4SG_4S$, причем этот глицин-сериновый спейсер был идентифицирован ранее для создания генетических химер. В случае усечения K187 также удаляли первые 39 аминокислот, чтобы получить фрагмент E40-K187 домена I Chx с SEQ ID NO: 5. Как описано выше, например, в ПРИМЕРЕ 10, конструкции с SEQ ID NO: 158 не удалось достичь апикального проникновения в эпителиальные клетки кишечника, конструкция с SEQ ID NO: 159 и SEQ ID NO: 160 претерпела эндоцитоз для достижения как апикального, так и базального пулов везикул внутри энтероцитов, но не достигла собственной пластинки, а конструкция с SEQ ID NO: 165 претерпела эндоцитоз, но не смогла мигрировать из апикального в базальный везикулярный компартмент энтероцита, и, наконец, конструкция с SEQ ID NO: 164 эффективно и быстро завершает трансцитоз. Таким образом, первые 206 аминокислот домена I Cholix были оценены на предмет элементов, которые могут участвовать в событиях, которые привели к апикально-базальному трансцитозу.

ПРИМЕР 18

Оценка Апикального эндоцитоза полученных из домена I Cholix Конструкций Доставки

[532] Сначала оценивали трансмембранный белок 123A (TMEM132A). TMEM132A представляет собой однопроходный трансмембранный белок, который содержит когезин и три тандемных иммуноглобулиновых домена, таким образом соединяя внеклеточную среду с внутриклеточным цитоскелетом. Было продемонстрировано взаимодействие между TMEM132A и серин/треонин-протеинфосфатазой 1 (PP1), обеспечивающее механизм регуляции внутриклеточных событий цитоскелета через мотив взаимодействия RVxF.

[533] Было обнаружено, что домен I Cholix (SEQ ID NO: 5, экспрессируется в бактериях) обогащает выделение TMEM132A вместе с каталитическими и регуляторными субъединицами комплекса PP1. Исследования на основе ELISA показали, что домен I Cholix с SEQ ID NO: 5 взаимодействует с внеклеточным доменом TMEM132A; Исследования SPR показали, что это взаимодействие происходит при pH 7,5 и меньше при pH 5,5. Исследования нокдауна на клетках Caco-2 для получения клеток Caco-2$^{TMEM132A-}$ показали, что уменьшение TMEM132A резко снижает транспортировку при трансцитозе домена I Cholix с SEQ ID NO: 5.

[534] Исследования внутрипросветной инъекции (ILI), проведенные в тощей кишке крысы, привели к совместной локализации конструкции доставки домена I Cholix-HGH (SEQ ID NO: 164) с TMEM132A, который был ограничен апикальной плазматической мембраной энтероцитов. Анализ динамики трансцитоза SEQ ID NO: 164 показал, что TMEM132A остается на апикальной плазматической мембране или рядом с ней и не перераспределяется в значительной степени в другие области этих поляризованных эпителиальных клеток. В то время как конструкция с SEQ ID NO: 158 существенно не попала в энтероциты после апикального применения, конструкция с SEQ ID NO: 159 попала, что позволяет предположить, что домен Ch важный для проникновения в апикальные клетки, состоит из 17 аминокислот, которые составляют различие между двумя несущими конструкциями. После интернализации внутренний pH ранней или рециркулирующей эндосомы может упасть с нейтрального до ~ 6,0. Исследование взаимодействий между конструкцией, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, и TMEM132A продемонстрировало, что они происходили в гораздо большей степени при pH 7,4 по сравнению с pH 5,5, что согласуется с теорией, согласно которой высвобождение из рецептора интернализации, в данном случае TMEM132A, может способствовать снижение pH везикул, которое может происходить после апикального поглощения Chx.

[535] Исследования, изучающие распределение клатрина в энтероцитах крыс, не выявили совместной локализации с конструкцией, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164 на апикальной поверхности, что позволяет предположить, что проникновение Chx может не включать опосредованное клатрином поглощение. Поразительно, что

клеточное распределение TMEM132A после применения конструкции с последовательностью SEQ ID NO: 164 оставалось на апикальной поверхности, но чаще обнаруживалось в апикальных везикулах после отделения конструкции с SEQ ID NO: 159, что позволяет предположить, что отсутствие других элементов в домене I Cholix (SEQ ID NO: 5) было необходимо для перехода к рецептору (или рецепторам), необходимому для следующего этапа его миграции. Эти результаты предполагают, что Chx может взаимодействовать с TMEM132A на поверхности просвета, и что эти взаимодействия участвуют в начальном процессе эндоцитоза из просвета кишечника и что последующие взаимодействия внутри ранних эндосом необходимы для продолжения процесса трансцитоза.

[536] Цитокератин 8 (CK-8) был одним из нескольких белков в этом семействе, идентифицированных при первоначальном скрининге в качестве потенциального партнера взаимодействия Chx; CK-8 был ранее идентифицирован как рецептор клеточной поверхности токсина домашних животных, секретируемого энтероагрегативной E. coli. Исследования связывания на основе ELISA показали, что CK-8 взаимодействует с TMEM132A, а также с Chx. Распределение CK-8 в энтероцитах крысы ограничивалось апикальной поверхностью и отдельными доменами в апикальном и базальном компартментах. Анализ динамики трансцитоза конструкции, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164 позволяет предположить, что распределение CK-8 в клетках не претерпело значительных изменений после апикального применения M+Cholix$^{1\text{-}265}$-HGH (SEQ ID NO: 164) и что некоторая совместная локализация наблюдалась в апикальном компартменте энтероцитов. Нокдаун CK-8 проводили в клетках Caco-2 (Caco-2$^{CK8\text{-}}$), и оценивали его влияние на трансцитоз конструкции, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164. Нокдаун CK-8, как дополнительно показано выше в ПРИМЕРЕ 15 не влиял на транспортировку конструкции, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, демонстрируя способность этой модели in vitro определять селективную функцию партнеров по взаимодействию в процессе трансцитоза Chx. Эти исследования указывают на то, что белки, идентифицированные при поглощении Chx, которые совместно локализуются с клеточными компартментами, в которые попадает конструкция, имеющая последовательность SEQ ID NO: 164, могут не иметь существенного значения для трансцитоза.

ПРИМЕР 19

Ранняя эндосомная сортировка конструкций доставки, полученных из домена I Cholix

[537] В этом примере показано, что разные белки, такие как GRP75, участвуют в ранней эндосомной сортировке Cholix и полученных из Cholix конструкций доставки (например, тех, что имеют аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 158 - SEQ ID NO: 165).

[538] Было продемонстрировано, что при трансцитозе конструкции для доставки постоянно мигрируют в больших количествах через энтероциты. Конкретные

компартменты, которые сильно совместно локализуются при этим трансцитозе, включали ранние эндосомы и поздние эндосомы. Носитель, полученный из Cholix, по-видимому, связан с покрытыми клатрином везикулами поблизости от ER-сеть Гольджи, организованной рядом с ядрами энтероцитов. Совместная локализация носителя, полученного из Cholix, наблюдалась с ER и ERGIC, также описано как LMAN1 (маннозосвязывающий лектин 1), но эта связь ограничена с элементами сети цис-Golgi, Golgi и транс-Гольджи. Носитель, полученный из Cholix, имеющий SEQ ID NO: 164, совместно локализуется с рециркулирующими эндосомами около базальной поверхности энтероцитов таким образом, чтобы его можно было скоординировать с перераспределением ERGIC. ERGIC-53 может также функционировать в качестве рецептора внутриклеточного груза, участвующего в антероградной транспортировке ограниченного количества гликопротеиновых лигандов на раннем пути экзоцитоза, и используется рядом РНК-вирусов как часть их стратегии экзоцитоза. Исследования связывания на основе ELISA продемонстрировали, что конструкция, имеющая последовательность SEQ ID NO: 164, может связываться с ERGIC-53 при pH 7,4, но это взаимодействие значительно сильнее при pH 5,5. Исследования SPR дополнительно подтвердили это pH-зависимое взаимодействие.

[539] Наблюдаемое распределение GPR75 как в апикальном, так и в базальном везикулярных компартментах энтероцитов не предполагает роли эффективного векторного механизма маршрутизации конструкции, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, от апикального до базального везикулярного компартмента; скорее, в локальных везикулярных пулах в каждом месте может иметь значение GPR75. Кроме того, не наблюдалось какого-либо нарушенного распределения GPR75, как это наблюдалось для действия других бактериальных эффекторных белков. Таким образом, можно предположить, что взаимодействия Chx с GPR75 могут обеспечивать некоторую функцию, отличную от маршрутизации пузырьков из апикального эндосомального компартмента в базальный эндосомный компартмент, и предположить, что функцией взаимодействия GPR75 может быть минимизация маршрутизации этого бактериального эффекторного белка от везикул к лизосомам в обоих местах.

[540] Дополнительные исследования TMEM132A продемонстрировали большую аффинность взаимодействия с конструкцией, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, при нейтральном значении pH по сравнению с кислым, что позволяет предположить, что после интернализации, конструкция, имеющая последовательность SEQ ID NO: 164, может найти другой рецептор для миграции, в то время как рецептор интернализации возвращается к апикальной поверхности клетки. Согласно этой гипотезе рецептор миграции должен иметь большую аффинность взаимодействия для Chx при кислом pH по сравнению с нейтральным. Действительно, исследование взаимодействий GPR75 с конструкцией, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, продемонстрировало более высокую аффинность между этими двумя молекулами при pH 5,5 по сравнению с pH 7,4.

[541] Эти данные демонстрируют, что описанные в настоящей заявке конструкции

доставки, полученные из Cholix, эффективно получают доступ в энтероциты (например, поляризованные эпителиальные клетки кишечника) и взаимодействуют с белками, участвующими в ранней эндосомной сортировке, позволяя этим конструкциям избежать путей внутриклеточной деградации, что приводит к доставке и транспортировке интактного носителя и груза, например, через эпителиальную клетку посредством трансцитоза и/или во внутреннюю часть посредством эндоцитоза.

ПРИМЕР 20

Внутриклеточная Сортировка конструкций доставки, полученный из домена I Cholix

[542] В этом примере показано, что конструкции доставки, полученные из домена I Cholix, во время внутриклеточной сортировки взаимодействуют с разными белками, такими как ERGIC-53.

[543] Введение в просвет конструкций доставки с SEQ ID NO: 164 в модели ILI у крыс предоставило данные для поддержки ERGIC-53 в качестве элемента, разрушаемого конструкциями Cholix согласно настоящему раскрытию, для обеспечения эффективного трансцитоза. До, а иногда сразу после апикального применения конструкции, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, ERGIC-53 наблюдали в отдельных популяциях энтероцитов, которые были сконцентрированы вблизи апикальной поверхности ядра клетки, в месте, где постоянно находится ERGIC. В течение нескольких минут после введения в просвет конструкции, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, наблюдали, что ERGIC-53 перемещается в области внутри энтероцитов, смежные с апикальной плазматической мембраной, и к базальному домену. Таким образом, трансцитоз носителя Cholix и перераспределение ERGIC-53 в базальную область энтероцитов совпадали.

[544] Поскольку ERGIC-53 участвует в экспорте гликопротеина из ER, исследовали клеточное распределение резидентного белка ER рибофорина 1 (субъединица 1 долихил-дифосфулигосахаридной протеингликозилтрансферазы), который опосредует события N-гликозилирования. Важно отметить, что рибофорин 1 наблюдался при использовании GRP75 при поглощении. Трансцитоз конструкции, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, наблюдался после ее ILI в тощую кишку крысы и не влиял на внутриклеточное распределение рибофорина 1, показывая, что он в ограниченной степени совместно локализуется в апикальном везикулярном компартменте, где рибофорин 1 присутствовал на протяжении всего периода времени, в течение которого ERGIC-53 проходил в базальный отсек. Кроме того, ERGIC-53 взаимодействует с группой белков, включая SEC24 в роли растворимого рецептора груза. Примечательно, что поглощение с GRP75 в качестве приманки идентифицировало SEC24. Точно так же апикальное применение конструкции, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, не вызывало серьезных изменений в организации внутриклеточного компартмента.

[545] ERGIC участвует в сортировке растворимых молекул, предназначенных для секреции из клетки, а ERGIC-53 подвергается процессу концентрированной сортировки, в

которой участвует белок оболочки COPII. Поскольку и COPI, и COPII участвуют в миграции везикул на поверхности раздела ER-Golgi, исследовали возможность совместной локализации этих белков оболочки с конструкцией, имеющей последовательность SEQ ID NO: 164, во время процесса трансцитоза. Энтероциты крысы продемонстрировали распределение COPI под апикальной плазматической мембраной и в супрануклеарном участке, согласующемся с аппаратом Гольджи, распределение, которое также наблюдали после апикального применения конструкции с SEQ ID NO: 158, которая не проникала в эти клетки, и конструкции с SEQ ID NO: 165, которая претерпела эндоцитоз, но осталась в апикальном везикулярном компартменте. Подобно тому, что наблюдается для необработанных тканей или тканей, подвергшихся воздействию конструкции с SEQ ID NO: 158, распределение ERGIC-53 (LMAN1) в энтероцитах, подвергшихся апикальному применению конструкции с SEQ ID NO: 159 или конструкции с SEQ ID NO : 165, осталось преимущественно в апикальном везикулярном компартменте с очень небольшим распределением в базальных везикулярных компартментов в энтероцитах (рис. 5). Движение ERGIC-53 (LMAN1) в базальный везикулярный компартмент спорадически наблюдалось в энтероцитах после апикального применения конструкции с SEQ ID NO: 159, и это движение было гораздо более последовательным в энтероцитах, обработанных апикально конструкцией с SEQ ID NO: 160 или конструкцией с SEQ ID NO: 164. Распределение COPI в энтероцитах, обработанных апикально конструкцией с SEQ ID NO: 160, теперь более очевидно в супрануклеарной области клетки, но теперь сосредоточено на апикальной поверхности и в апикальном везикулярном компартменте, где он до некоторой степени совместно локализован с ERGIC-53 (LMAN1).

[546] Апикальное применение конструкции с SEQ ID NO: 159 или конструкции с SEQ ID NO: 165 привело к совместной локализации HGH с COPI под апикальной мембраной и в супрануклеарной области, причем явления ограниченной совместной локализации наблюдались в области апикального везикулярного пула энтероцитов. Апикальная обработка конструкцией с SEQ ID NO: 160 приводила к обширной совместной локализации HGH с COPI под апикальной мембраной и некоторым совместным локализациям в апикальном везикулярном компартменте и меньшему количеству явлений совместной локализации в супрануклеарной области.

[547] Эти данные демонстрируют, что полученные из Cholix конструкции доставки, такие как те, что имеют аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159 и SEQ ID NO: 165, можно использовать для доставки различных грузовых молекул во внутриклеточные компартменты эпителиальной клетки. Это может быть в частности полезно для нацеленной доставки терапевтических и/или биологически активных молекул, способных вызывать терапевтическое и/или биологическое действие в этих местах.

ПРИМЕР 21

Базальная Секреции конструкций доставки, полученных из домена I Cholix

[548] В этом примере показан механизм, который можно использовать для обеспечения эффективного базального высвобождения полученных из Cholix конструкций доставки, обеспечивая эффективную транспортировку груза через эпителиальные слои (например, эпителий кишечника).

[549] Специфичный для базальной мембраны белок гепарансульфат-протеогликан (HSPG, HSPG2 или перлекан), неотъемлемый компонент базальных мембран, поддерживающих простой столбчатый эпителий кишечника, идентифицировали в начальных исследованиях по захвату (см., например, фиг.29, фиг.30). Перлекан модулируется тирозинфосфатазой (PTPN6) и взаимодействует с белком 1, содержащим домен фактора А фон Виллебранда (VWA1), оба из которых также были обогащены при захватах с поглощением с использованием конструкции с SEQ ID NO: 164.

[550] Стабильных нокдаун перлекана в клетках Caco-2 (Caco-2^{HSPG2-}), выращенных в поляризованном формате, значительно снижает способность конструкции с SEQ ID NO: 164 к полному трансцитозу in vitro. Исследования связывания на основе ELISA продемонстрировали, что Chx может связываться с перлеканом. Исследования SPR показали, что Chx взаимодействует с перлеканом при pH 5,5, но не при pH 7,4.

[551] В энтероцитах от необработанных животных после апикального воздействия конструкцией с SEQ ID NO: 158 перлекан-положительное иммуномечение наблюдалось в везикулах, которые были распределены в апикальном, супрануклеарном и базальном компартментах; распределение ERGIC-53 (LAMN1) было ограничено местоположением между апикальным и супрануклеарным компартментами (Фиг. 9D). Апикальное применение конструкции с SEQ ID NO: 164 привело к уменьшению относительного мечения перлекана, наблюдаемому в супрануклеарном компартменте, и совместной локализации с ERGIC-53 (LAMN1) в апикальном и базальном компартментах с областью под просветной плазматической мембраной, положительной по ERGIC-53 (LAMN1), но не по перлекану. ERGIC-53 (LAMN1), присутствующий в области под люминальной плазматической мембраной, был положительным для конструкции с SEQ ID NO: 164, но не содержал перлекан. Везикулы, положительные по HGH, были также положительны по ERGIC-53 (LAMN1) или перлекану или обоим в разной степени в апикальном и базальном компартментах. Поразительная совместная локализация конструкции с SEQ ID NO: 164, ERGIC-53 (LAMN1) и перлеканом в этих компартментах и предполагает, что Cholix может мигрировать на базальную сторону клетки с ERGIC-53 (LAMN1) и/или перлеканом (и/или, возможно, с другими взаимодействующими элементами), где он может высвобождаться в процессе экзоцитоза.

[552] Примечательно, что описанный в настоящей заявке путь трансцитоза Chx предполагает, что полученные из Cholix белки-носители, связанные с гетерологичным (полученным не из Cholix) грузом, не приводят к клеточной дезорганизации, за исключением разрушения ERGIC-53 (LAMN1), что указывает на то, что описанные в настоящей заявке механизмы доставки груза (например, терапевтического) не нарушают эпителиальный слой или саму клетку. Таким образом, высокоэффективная доставка груза

без повреждения эпителия самой конструкции доставки может быть важной особенностью описанных в настоящей заявке конструкций и способов доставки. Это может обеспечить доставку различных терапевтических и/или диагностических или других грузовых молекул неинвазивным образом, потенциально обеспечивая стандарты безопасности и терапевтической эффективности.

[553] Эти данные демонстрируют, что конкретные белки (например, ERGIC-53, рибофилин 1, SEC24, CK-8, TMEM132A, GPR75 и перлекан) участвуют в миграции конструкции доставки, полученной из домена I Cholix, через эпителиальную клетку и обеспечивают ее высвобождение из базальной мембраны. Идентичность отдельных партнеров по взаимодействию и зависимости этих взаимодействий от pH могут быть особенно полезны для терапевтических вариантов применения, поскольку описанный в настоящей заявке путь миграции позволяет доставлять носители, полученные из домена Cholix I, связанные с различными грузовыми молекулами, для достижения базолатерального компартмента (например, собственной пластинки) с использованием эндогенных путей миграции. Однако, как показано в ПРИМЕРЕ 11 выше, определенные функциональные элементы домена I Cholix (и PE) позволяют доставлять гетерологичный груз в различные места внутри эпителия и/или через него.

[554] Таким образом, описанные в настоящей заявке мультирецепторные, мультикомпартментные пути, используемые конструкциями доставки, полученными из Cholix, для эффективного обеспечения трансцитоза, могут обеспечить потенциальную дорожную карту для пероральной доставки терапевтических молекул (например, терапевтических белков, таких как терапевтические антитела), которые можно соединить с носителем домена I Cholix или с полученным из него носителем.

ПРИМЕР 22

Функциональные пептидные фрагменты домена I Cholix расположены на Поверхности Белка

[555] В этом примере показано, что части элементов функциональной последовательности домена I Cholix, которые описаны в настоящей заявке для стимуляции трансцитоза и апикально-базальной миграции, расположены на поверхности белка домена I экзотоксина Cholix.

[556] Анализ структуры белка продемонстрировал, что функциональные элементы, необходимые для апикального эндоцитоза, апикально-базальной миграции и базального высвобождения, находятся рядом друг с другом на поверхности белка домена I Cholix.

[557] Поверхностная модель экспрессируемого бактериями домена I Cholix (SEQ ID NO: 5) использовали для выделения выбираемых зон потенциально интересных в этом процессе трансцитоза из-за их проекции с поверхности белка (фиг. **32**). Интересно отметить, что две области аминокислот между M^{1} и G^{40} находятся рядом с открытыми на поверхности аминокислотами D^{151}-A^{187} и A^{187}-L^{206}. Конкретно, L^{18}-I^{26} (домен X1) и T^{171}-I^{176} (домен X2) скоординированы с образованием кармана, окруженного несколькими отрицательными зарядами. Аналогично, K^{187}-H^{203} (домен X3) скоординированы с I^{32}-E^{40}

(домен X4) с образованием непрерывной гребневой структуры (фиг. **32A**-фиг. **32D**).

[558] Эти данные показывают, что части аминокислотной последовательности домена I Cholix, которые удалены друг от друга с точки зрения аминокислотного положения в последовательности, на самом деле могут находиться в непосредственной близости друг от друга в трехмерной конфигурации белка домена I Cholix. Эти данные свидетельствуют о том, что трехмерная структура и морфология поверхности домена I Cholix обеспечивает взаимодействие с рецепторами и рецепторными элементами, необходимыми для эффективного эндоцитоза и/или транспортировки эпителиальной клетки. Это может быть полезно для разработки перорально вводимых терапевтических средств, содержащих такие молекулы-носители, полученные из домена Cholix I, для обеспечения терапевтически эффективных доз в базолатеральных компартментах, собственной пластинке и т.д., чтобы вызвать терапевтические эффекты.

[559] Все изделия и способы, раскрытые и заявленные в настоящей заявке, могут быть созданы и выполнены без излишних экспериментов в свете настоящего раскрытия. Хотя изделия и способы согласно этому раскрытию были описаны в терминах вариантов осуществления, специалистам в данной области техники будет очевидно, что изделия и способы могут быть подвержены изменениям без отклонения от сущности и объема раскрытия. Все такие изменения и эквиваленты, очевидные для специалистов в данной области, существующие в настоящее время или разработанные позже, считаются находящимися в пределах сущности и объема раскрытия, определенного прилагаемой формулой изобретения. Все патенты, заявки на патенты и публикации, упомянутые в описании, указывают на уровень специалистов в области, к которой относится настоящее раскрытие. Все патенты, заявки на патенты и публикации полностью включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей и в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки в полном объеме для любых и всех целей. Раскрытие, иллюстративно описанное в настоящей заявке, подходящим образом может быть осуществлено на практике в отсутствие какого-либо элемента (элементов), конкретно не раскрытого в настоящей заявке. Термины и выражения, которые были использованы, используются в качестве терминов описания, а не ограничения, и нет намерения при использовании таких терминов и выражений исключить какие-либо эквиваленты показанных и описанных функций или их частей, но правомочно, чтобы в объеме заявленного раскрытия были возможны различные модификации. Таким образом, следует понимать, что, хотя настоящее раскрытие было конкретно раскрыто с помощью вариантов осуществления и необязательных признаков, специалисты в данной области могут прибегать к модификациям и вариациям концепций, раскрытых в настоящей заявке, и что такие модификации и вариации рассматриваются в объеме этого раскрытия, который определен прилагаемой формулой изобретения.

Список последовательностей

[560] SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность из 634 аминокислот

зрелого токсина Cholix Vibrio cholera.

[561] SEQ ID NO: 2 представляет собой последовательность из 634 аминокислот зрелого токсина Cholix Vibrio cholera.

[562] SEQ ID NO: 3 представляет собой нетоксичный (nt) вариант зрелого токсина Cholix V. cholera.

[563] SEQ ID NO: 4 представляет собой домен I токсина Cholix.

[564] SEQ ID NO: 5 представляет собой домен I токсина Cholix, содержащий N-концевой метиониновый остаток (например, вследствие бактериальной экспрессии).

[565] SEQ ID NO: 6 - SEQ ID NO: 125 представляют собой, усеченные варианты домена I Cholix.

[566] SEQ ID NO: 126 представляет собой аминокислотную последовательность транслокационного домена (домена II) носителя Cholix V. cholera.

[567] SEQ ID NO: 127 представляет собой аминокислотную последовательность домена Ib Cholix носителя V. cholera.

[568] SEQ ID NO: 128 представляет собой аминокислотную последовательность каталитического домена (домена III) носителя Cholix V. cholera.

[569] SEQ ID NO: 129 представляет собой аминокислотную последовательность $Cholix^{1-425}$.

[570] SEQ ID NO: 130 представляет собой аминокислотную последовательность $Cholix^{1-415}$.

[571] SEQ ID NO: 131 представляет собой аминокислотную последовательность $Cholix^{1-397}$.

[572] SEQ ID NO: 132 представляет собой аминокислотную последовательность $Cholix^{1-386}$.

[573] SEQ ID NO: 133 представляет собой аминокислотную последовательность $Cholix^{1-291}$.

[574] SEQ ID NO: 134 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую зрелый токсин Cholix Vibrio cholera SEQ ID NO: 2.

[575] SEQ ID NO: 135 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую последовательность из 613 аминокислот зрелого экзотоксина A Pseudomonas (PE).

[576] SEQ ID NO: 136 представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую зрелый экзотоксин A Pseudomonas (PE) SEQ ID NO: 135.

[577] SEQ ID NO: 137 представляет собой аминокислотную последовательность рецепторсвязывающего домена (домена I) экзотоксина A Pseudomonas (PE).

[578] SEQ ID NO: 138 представляет собой аминокислотную последовательность транслокационного домена (домена II) экзотоксина A Pseudomonas (PE).

[579] SEQ ID NO: 139 представляет собой аминокислотную последовательность домена Ib экзотоксина A Pseudomonas (PE).

[580] SEQ ID NO: 140 представляет собой аминокислотную последовательность

каталитического домена (домена III) экзотоксина A Pseudomonas (PE).

[581] SEQ ID NO: 141 представляет собой аминокислотную последовательность PE^{1-404}.

[582] SEQ ID NO: 142 представляет собой аминокислотную последовательность PE^{1-395}.

[583] SEQ ID NO: 143 представляет собой аминокислотную последовательность PE^{1-375}.

[584] SEQ ID NO: 144 представляет собой аминокислотную последовательность PE^{1-364}.

[585] SEQ ID NO: 145 представляет собой аминокислотную последовательность PE^{1-277}.

[586] SEQ ID NO: 146 представляет собой аминокислотную последовательность гибридной конструкции доставки.

[587] SEQ ID NO: 147 представляет собой аминокислотную последовательность гибридной конструкции доставки.

[588] SEQ ID NO: 148 представляет собой аминокислотную последовательность функциональной пептидной последовательности, полученной из домена I Cholix (например, для эндоцитоза).

[589] SEQ ID NO: 149 представляет собой аминокислотную последовательность функциональной пептидной последовательности, полученной из домена I Cholix (например, для апикально-базальной транспортировки).

[590] SEQ ID NO: 150 представляет собой аминокислотную последовательность функциональной пептидной последовательности, полученной из домена I Cholix (например, для апикально-базальной транспортировки).

[591] SEQ ID NO: 151 представляет собой аминокислотную последовательность функциональной пептидной последовательности, полученной из домена I Cholix (например, для супрануклеарной локализации).

[592] SEQ ID NO: 152 представляет собой аминокислотную последовательность функциональной пептидной последовательности, полученной из домена I Cholix (например, для базального высвобождения).

[593] SEQ ID NO: 153 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки, полученной из Cholix, содержащей гормон роста человека (HGH).

[594] SEQ ID NO: 154 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки, полученной из Cholix, содержащей интерлейкин-10 (IL-10).

[595] SEQ ID NO: 155 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки, полученной из Cholix, содержащей интерлейкин-10 (IL-22).

[596] SEQ ID NO: 156 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки, полученной из Cholix, содержащей красный флуоресцентный белок (RFP).

[597] SEQ ID NO: 157 представляет собой аминокислотную последовательность

полученной из Cholix (включая нетоксичный зрелый Cholix) конструкции доставки, содержащей красный флуоресцентный белок (RFP).

[598] SEQ ID NO: 158 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки из усеченного домена I Cholix, содержащей HGH.

[599] SEQ ID NO: 159 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки из усеченного домена I Cholix, содержащей HGH.

[600] SEQ ID NO: 160 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки из усеченного домена I Cholix, содержащей HGH.

[601] SEQ ID NO: 161 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки из усеченного домена I Cholix, содержащей HGH.

[602] SEQ ID NO: 162 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки из усеченного домена I Cholix, содержащей HGH.

[603] SEQ ID NO: 163 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки из усеченного домена I Cholix, содержащей HGH.

[604] SEQ ID NO: 164 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки из домена I Cholix, содержащей HGH.

[605] SEQ ID NO: 165 представляет собой аминокислотную последовательность конструкции доставки из усеченного домена I Cholix, содержащей HGH.

[606] SEQ ID NO: 166 - SEQ ID NO: 186 представляют собой аминокислотные последовательности различных сайтов расщепления пептидаз.

[607] SEQ ID NO: 187 - SEQ ID NO: 193 представляют собой аминокислотные последовательности различных пептидов, связывающих рецептор GM-1.

[608] SEQ ID NO: 194 - SEQ ID NO: 206 представляют собой аминокислотные последовательности различных расщепляемых спейсеров.

[609] SEQ ID NO: 207 - SEQ ID NO: 213 представляют собой аминокислотные последовательности различных нерасщепляемых спейсеров.

[610] SEQ ID NO: 214 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого гормона роста (HGH).

[611] SEQ ID NO: 215 представляет собой аминокислотную последовательность пептида агониста GLP-1.

[612] SEQ ID NO: 216 представляет собой аминокислотную последовательность инсулинового пептида.

[613] SEQ ID NO: 217 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого интерлейкина-10 (IL-10).

[614] SEQ ID NO: 218 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого интерлейкина-22 (IL-22).

[615] SEQ ID NO: 219 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида ExtB.

[616] SEQ ID NO: 220 представляет собой аминокислотную последовательность красного флуоресцентного белка (RFP).

[617] SEQ ID NO: 221 представляет собой аминокислотную последовательность носителя, полученного из домена I Cholix, соединенного со спейсером.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная конструкция доставки, содержащая:

носитель, полученный из домена I экзотоксина и с отсутствующим доменом II, доменом Ib и доменом III экзотоксина, соединенный с гетерологичным грузом.

2. Конструкция доставки по п. 1, в которой носитель по существу состоит из домена I экзотоксина.

3. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-2, причем конструкция доставки доставляет гетерологичный груз согласно одному или нескольким из следующих путей:

через эпителиальную клетку посредством трансцитоза;

к базальной стороне эпителиальной клетки;

в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки; или

во внутреннюю часть эпителиальной клетки посредством эндоцитоза.

4. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-3, в которой носитель выполнен с возможностью доставки гетерологичного груза к базальной стороне эпителиальной клетки.

5. Выделенная конструкция доставки, содержащая:

химерный носитель, содержащий внутриклеточный эпителиальный нацеливающий домен; соединенный с гетерологичным грузом.

6. Выделенная конструкция доставки, содержащая:

химерный носитель, содержащий супрануклеарный эпителиальные нацеливающий домен; соединенный с гетерологичным грузом.

7. Выделенная конструкция доставки, содержащая:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом, причем носитель взаимодействует с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана,

и не проявляет взаимодействие с одним или более элементами из клатрина или GPR78 или их комбинацией.

8. Выделенная конструкция доставки по п.7, причем взаимодействием является селективное взаимодействие.

9. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 7-8, причем взаимодействием является pH-зависимое взаимодействие.

10. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 7-9, причем взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана происходит на поверхности эпителиальной клетки, во внутренней части эпителиальной клетки или представляет собой их комбинацию.

11. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-4, причем доставка гетерологичного груза через эпителиальную клетку происходит in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки в базолатеральный компартмент.

12. Выделенная конструкция доставки по п.5, причем доставка гетерологичного груза происходит in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки во внутреннюю часть эпителиальной клетки.

13. Выделенная конструкция доставки по п.6, причем доставка гетерологичного груза происходит in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки.

14. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 7-10, причем взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана или их комбинацией происходит in vitro на апикальной поверхности эпителиальной клетки, во внутренней части эпителиальной клетки или представляет собой их комбинацию.

15. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 10-14, причем эпителиальной клеткой является поляризованная эпителиальная клетка.

16. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 10-15, причем поляризованная эпителиальная клетка является частью монослоя поляризованных эпителиальных клеток.

17. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 10-16, причем поляризованная эпителиальная клетка происходит от грызуна или человека.

18. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 10-17, причем поляризованная эпителиальная клетка происходит от человека.

19. Выделенная конструкция доставки по п.18, причем человеческой поляризованной эпителиальной клеткой является человеческая поляризованная эпителиальная клетка кишечника.

20. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 18-19, причем человеческой поляризованной эпителиальной клеткой кишечника является клетка Caco-2.

21. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-4, причем доставка гетерологичного груза через эпителиальную клетку происходит in vivo из кишечника субъекта в базолатеральный компартмент субъекта.

22. Выделенная конструкция доставки по п.5, причем доставка гетерологичного груза происходит in vivo из кишечника субъекта во внутреннюю часть эпителиальной клетки субъекта.

23. Выделенная конструкция доставки по п.6, причем доставка гетерологичного груза происходит in vivo из кишечника субъекта в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки субъекта.

24. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 7-10, причем взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и перлекана или их комбинацией происходит in vivo на апикальной поверхности эпителиальной клетки субъекта, во внутренней части эпителиальной клетки субъекта или представляет собой их комбинацию.

25. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 21-24, причем субъектом

является грызун или человек.

26. Выделенная конструкция доставки по п.25, причем субъектом является человек с одним или более следующими заболеваниями: воспалительное заболевание кишечника, псориаз, бактериальный сепсис, системная красная волчанка (SLE), вульгарная пузырчатка, миастения гравис, гемолитическая анемия, тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Грейвса, болезнь Шегрена, дерматомиозит, болезнь Хашимото, полимиозит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз (MS), сахарный диабет, ревматоидный артрит, склеродермия, неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, хроническая лимфоцитарная лейкемия, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественная миелома, карцинома мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки, злокачественная меланома, резистентная к ритуксимабу NHL или лейкемия, диабет, ожирение, диабет вследствие ожирения, гипергликемия, дислипидемия, гипертриглицеридемия, синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическая дислипидемия, гиперлипидемия, дефицит гормона роста (GHD), синдром Тернера (TS), синдром Нунан, синдром Прадера-Вилли, дефицит гомеобокс-содержащего гена низкого роста (SHOX), хроническая почечная недостаточность или синдром короткой кишки с идиопатической низкорослостью.

27. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 21-26, причем эпителиальной клеткой является поляризованная эпителиальная клетка.

28. Выделенная конструкция доставки по п.27, причем поляризованной эпителиальной клеткой является поляризованная эпителиальная клетка кишечника.

29. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 5-10, причем носителем является малая молекула, полипептид, аптамер или их комбинация.

30. Выделенная конструкция доставки по п.29, причем носителем является малая молекула.

31. Выделенная конструкция доставки по п.29, причем носителем является полипептид.

32. Выделенная конструкция доставки по п.31, причем полипептидом является антитело или его функциональный фрагмент.

33. Выделенная конструкция доставки по п.29, причем носителем является аптамер.

34. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 29-33, причем носитель получен из экзотоксина.

35. Выделенная конструкция доставки по п.34, причем носитель получен из домена I экзотоксина и не имеет домена II, домена Ib и домен III экзотоксина.

36. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-35, причем носитель, который получен из домена I экзотоксина, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью домена I экзотоксина или

по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, причем экзотоксин представляет собой токсин Cholix или экзотоксин A Pseudomonas.

37. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-36, в которой носитель содержит по меньшей мере 110 аминокислотных остатков домена I экзотоксина.

38. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-37, в которой носитель содержит по меньшей мере 50 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина.

39. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-38, причем носитель, у которого отсутствует домен II, домен Ib и домен III экзотоксина, содержит часть домена II, домена Ib или домена III экзотоксина или их комбинацию.

40. Выделенная конструкция доставки по п.39, причем часть содержит не более 70% аминокислотных остатков домена II, домена Ib или домена III экзотоксина.

41. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-40, причем экзотоксин представляет собой токсин Cholix.

42. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-41, в которой носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

43. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

44. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

45. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

46. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее

функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

47. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

48. Выделенная конструкция доставки по п.47, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или ее функциональный фрагмент.

49. Выделенная конструкция доставки по п.47, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или ее функциональный фрагмент.

50. Выделенная конструкция доставки по п.47, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 или ее функциональный фрагмент.

51. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

52. Выделенная конструкция доставки по п.51, причем носитель имеет пространственную структуру, в которой один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 148 или SEQ ID NO: 149 находятся в непосредственной близости с одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 151, а один или более аминокислотных остатков SEQ ID NO: 148 или SEQ ID NO: 149 находятся в непосредственной близости с одним или более аминокислотными остатками SEQ ID NO: 152.

53. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

54. Выделенная конструкция доставки по п.53, в которой носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-187 или 1-206 SEQ ID NO: 11 или 1-186 или 1-205 SEQ ID NO: 10.

55. Выделенная конструкция доставки по п.54, в которой носитель содержит остатки 1-187 SEQ ID NO: 30 или 1-186 SEQ ID NO: 31 и не более 206 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

56. Выделенная конструкция доставки по п.53, в которой носитель содержит

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 10 - SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

57. Выделенная конструкция доставки по п.53, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или ее функциональный фрагмент.

58. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

59. Выделенная конструкция доставки по п.58, в которой носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-151 или 1-187 SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

60. Выделенная конструкция доставки по п.58, в которой у носителя отсутствует любой один или более аминокислотных остатков 1-39 SEQ ID NO: 5 или аминокислотных остатков 1-38 SEQ ID NO: 4.

61. Выделенная конструкция доставки по п.58, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

62. Выделенная конструкция доставки по п.58, в которой носитель содержит остатки 1-151 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-150 SEQ ID NO: 4 и не более 187 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

63. Выделенная конструкция доставки по п.58, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

64. Выделенная конструкция доставки по п.58, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или ее функциональный фрагмент.

65. Выделенная конструкция доставки по п.42, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

66. Выделенная конструкция доставки по п.65, в которой носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-150 SEQ ID NO: 6 или одного или более аминокислотных остатков 1-151 SEQ ID NO: 7.

67. Выделенная конструкция доставки по п.65, в которой носитель содержит остатки 1-134 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-133 SEQ ID NO: 4 и не более 151 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

68. Выделенная конструкция доставки по п.65, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 106 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

69. Выделенная конструкция доставки по п.65, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или ее функциональный фрагмент.

70. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-69, причем выделенная конструкция доставки содержит по меньшей мере одну, но не более 20 бета цепей.

71. Выделенная конструкция доставки по п.41, причем конструкция доставки содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156 или SEQ ID NO: 158 - SEQ ID NO: 165 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

72. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-42, в которой экзотоксином является экзотоксин A Pseudomonas.

73. Выделенная конструкция доставки по п.72, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 80% идентичность с ее функциональным фрагментом.

74. Выделенная конструкция доставки по п.73, в которой носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-252 SEQ ID NO: 137.

75. Выделенная конструкция доставки по п.73, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

76. Выделенная конструкция доставки по п.73, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

77. Выделенная конструкция доставки по п.73, в которой носитель содержит

аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

78. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 72-73, в которой носитель содержит не более 252 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 134.

79. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 72-73, в которой носитель содержит остатки 1-252 SEQ ID NO: 134.

80. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-79, в которой носитель дополнительно содержит по меньшей мере один N-концевой метиониновый остаток.

81. Выделенная конструкция доставки по п.80, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

82. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-81, причем конструкция доставки образует мультимер.

83. Выделенная конструкция доставки по п.82, в которой мультимер образован путем мультимеризации гетерологичного груза.

84. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 82-83, в которой мультимер представляет собой гетеромер или гомомер.

85. Выделенная конструкция доставки по п.84, в которой гомомер представляет собой гомодимер.

86. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 84-85, в которой гомодимер образован путем димеризации гетерологичного груза.

87. Выделенная конструкция доставки, содержащая: носитель, содержащий первую часть и вторую часть, причем первую часть получают из первого экзотоксина, а вторую часть получают из второго экзотоксина, соединенного с гетерологичным грузом.

88. Выделенная конструкция доставки по п.87, в которой первым экзотоксином является Cholix.

89. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-88, в которой вторым экзотоксином является PE.

90. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-89, в которой первая часть получена из домена I, домена II, домена Ib или домена III Cholix или любых их комбинаций.

91. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-90, причем первая часть содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125 или SEQ ID NO: 133, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

92. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-91, причем первая

часть содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

93. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-92, причем первая часть содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

94. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-93, в которой вторая часть получена из домена I, домена II, домена Ib или домена III PE или любых их комбинаций.

95. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-94, в которой вторая часть содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 145, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

96. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-95, в которой первая часть химически соединена или рекомбинантно соединена со второй частью.

97. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-96, в которой первая часть прямо или непрямо соединена со второй частью.

98. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 87-97, в которой носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147.

99. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-98, в которой носитель химически соединен или рекомбинантно соединен с гетерологичным грузом.

100. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-99, в которой носитель ковалентно соединен с гетерологичным грузом.

101. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-100, в которой гетерологичный груз соединен с С-концом носителя.

102. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-101, в которой гетерологичный груз соединен с N-концом носителя.

103. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-102, в которой носитель соединен прямо с гетерологичным грузом.

104. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-103, в которой носитель непрямо соединен с гетерологичным грузом.

105. Выделенная конструкция доставки по п.104, в которой носитель соединен с гетерологичным грузом посредством спейсера.

106. Выделенная конструкция доставки по п.105, в которой спейсер представляет

собой аминокислотный спейсер.

107. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 105-106, в которой аминокислотный спейсер имеет от 1 до 50 аминокислотных остатков в длину.

108. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 105-107, в которой аминокислотный спейсер содержит один или более глициновых остатков и один или более сериновых остатков.

109. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 105-108, в которой спейсер представляет собой расщепляемый спейсер.

110. Выделенная конструкция доставки по п.109, в которой расщепляемый спейсер содержит аминокислотную последовательность по любой из SEQ ID NO: 174 - SEQ ID NO: 206.

111. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 105-108, в которой спейсер представляет собой нерасщепляемый спейсер.

112. Выделенная конструкция доставки по п.111, в которой нерасщепляемый спейсер содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей GTGGS (SEQ ID NO: 207), GGGGS (SEQ ID NO: 208), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 209), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210) или GGGGSGGG (SEQ ID NO: 211).

113. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 111-112, в которой нерасщепляемый спейсер содержит одну или несколько $(GGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 212), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

114. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 111-113, в которой нерасщепляемый спейсер содержит одну или несколько $(GS)_x$ (SEQ ID NO: 213), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

115. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 105-107, в которой спейсер представляет собой один или более фрагментов домена II, домена Ib или домена III экзотоксина или их комбинаций.

116. Выделенная конструкция доставки по п.115, в которой спейсер содержит не более 80 аминокислотных остатков домена II, 80 аминокислотных остатков домена III или их комбинаций.

117. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-116, в которой гетерологичным грузом является макромолекула, малая молекула, полипептид, нуклеиновая кислота, мРНК, микроРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловая молекула, антитело, ДНК, плазмида, вакцина, полимер, наночастица или каталитически активный материал.

118. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-117, в которой гетерологичным грузом является биологически активный груз.

119. Выделенная конструкция доставки по п.118, в которой биологически активным грузом является цитокин, гормон, терапевтическое антитело, его функциональный фрагмент или любые их комбинации.

120. Выделенная конструкция доставки по п.119, в которой цитокином является IL-

1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29 или IL-30.

121. Выделенная конструкция доставки по п.119, в которой цитокин имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или SEQ ID NO: 218.

122. Выделенная конструкция доставки по п.119, в которой гормон имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или SEQ ID NO: 216.

123. Выделенная конструкция доставки по п.119, в которой терапевтическим антителом является антитело к TNFa.

124. Выделенная конструкция доставки по п.123, в которой антителом против TNFa является адалимумаб или инфликсимаб.

125. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 1-117, в которой гетерологичным грузом является обнаруживаемое средство.

126. Выделенная конструкция доставки по п.125, в которой обнаруживаемым средством является флуорофор, контрастное средство, рентгеноконтрастное средство, PET средство, наночастица или радиоизотоп.

127. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 125-126, в которой флуорофором является красный флуоресцентный белок (RFP).

128. Выделенная конструкция доставки по любому из пп. 126-127, в которой RFP имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220.

129. Фармацевтическая композиция, содержащая:

выделенную конструкцию доставки по любому из пп. 1-128; и

фармацевтически приемлемый носитель.

130. Фармацевтическая композиция по п.129, причем композиция составлена для перорального введения, местного введения, легочного введения, интраназального введения, буккального введения, сублингвального введения или введения в глаза.

131. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 129-130, причем композиция составлена для перорального введения.

132. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 129-131, причем композиция составлена в виде капсулы или таблетки.

133. Полинуклеотид, кодирующий выделенную конструкцию доставки по любому из пп. 1-128.

134. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.133.

135. Клетка-хозяин, содержащая вектор, который экспрессирует конструкцию доставки, причем клетка-хозяин содержит вектор по п.134.

136. Способ доставки гетерологичного груза через эпителиальную клетку, включающий:

нанесение конструкции доставки на апикальную поверхность эпителиальной клетки; и

доставку конструкции доставки к базальной стороне эпителиальной клетки со

скоростью более 10^{-6} см/сек,

причем конструкция доставки содержит:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом.

137. Способ по п.136, дополнительно включающий высвобождение конструкции доставки с базальной стороны эпителиальной клетки после доставки через эпителиальную клетку.

138. Способ по любому из пп. 136-137, причем носитель выполнен с возможностью доставки гетерологичного груза к базальной стороне эпителиальной клетки.

139. Способ доставки гетерологичного груза во внутреннюю часть эпителиальной клетки посредством эндоцитоза, включающий:

нанесение конструкции доставки на апикальную поверхность эпителиальной клетки; и

доставку конструкции доставки во внутреннюю часть эпителиальной клетки посредством эндоцитоза,

причем конструкция доставки содержит:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом.

140. Способ доставки гетерологичного груза в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки посредством эндоцитоза, включающий:

нанесение конструкции доставки на апикальную поверхность эпителиальной клетки; и

доставку конструкции доставки в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки посредством эндоцитоза,

причем конструкция доставки содержит:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом.

141. Способ взаимодействия с рибофилином 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлеканом или их комбинацией, включающий:

нанесение конструкции доставки на апикальную поверхность эпителиальной клетки; и

взаимодействие конструкции доставки с рибофилином 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлеканом или их комбинацией,

причем конструкция доставки содержит:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом.

142. Способ по п.141, в котором носитель взаимодействует с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана или их комбинацией и не проявляет взаимодействие с одним или более элементами из клатрина или GPR78 или их комбинацией.

143. Способ по любому из пп. 141-142, в котором взаимодействием является селективное взаимодействие или pH-зависимое взаимодействие или их комбинация.

144. Способ по любому из пп. 141-143, в котором взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-

53 или перлекана происходит на поверхности эпителиальной клетки, во внутренней части эпителиальной клетки или представляет собой их комбинацию.

145. Способ лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конструкции доставки, содержащей:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом;

причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз внутрь эпителиальной клетки.

146. Способ лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конструкции доставки, содержащей:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом;

причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки.

147. Способ диагностики заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конструкции доставки, содержащей:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом;

причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз внутрь эпителиальной клетки.

148. Способ диагностики заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конструкции доставки, содержащей:

носитель, соединенный с гетерологичным грузом;

причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки.

149. Способ лечения заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конструкции доставки, содержащей:

носитель, полученный из домена I экзотоксина и с отсутствующим доменом II, доменом Ib и доменом III экзотоксина, соединенный с гетерологичным грузом;

причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз посредством трансцитоза через эпителиальную клетку.

150. Способ диагностики заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту конструкции доставки, содержащей:

носитель, полученный из домена I экзотоксина и с отсутствующим доменом II, доменом Ib и доменом III экзотоксина, соединенный с гетерологичным грузом;

причем конструкция доставки способна доставлять гетерологичный груз посредством трансцитоза через эпителиальную клетку.

151. Способ по любому из пп. 136-138, в котором доставка гетерологичного груза через эпителиальную клетку происходит in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки в базолатеральный компартмент.

152. Способ по п.139, в котором доставка гетерологичного груза происходит in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки во внутреннюю часть эпителиальной клетки.

153. Способ по п.140, в котором доставка гетерологичного груза происходит in vitro от апикальной поверхности эпителиальной клетки в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки.

154. Способ по любому из пп. 140-144, в котором взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 или перлекана или их комбинацией происходит in vitro на апикальной поверхности эпителиальной клетки, во внутренней части эпителиальной клетки или представляет собой их комбинацию.

155. Способ по любому из пп. 151-154, причем эпителиальной клеткой является поляризованная эпителиальная клетка.

156. Способ по любому из пп. 151-155, причем поляризованная эпителиальная клетка является частью монослоя поляризованных эпителиальных клеток.

157. Способ по любому из пп. 151-156, причем поляризованная эпителиальная клетка происходит от грызуна.

158. Способ по любому из пп. 151-156, причем поляризованная эпителиальная клетка происходит от человека.

159. Способ по п.158, причем человеческой поляризованной эпителиальной клеткой является человеческая поляризованная эпителиальная клетка кишечника.

160. Способ по п.159, причем человеческой поляризованной эпителиальной клеткой кишечника является клетка Caco-2.

161. Способ по любому из пп. 136-138, в котором доставка гетерологичного груза через эпителиальную клетку происходит in vivo из кишечника субъекта в базолатеральный компартмент субъекта.

162. Способ по п.139, в котором доставка гетерологичного груза происходит in vivo из кишечника субъекта во внутреннюю часть эпителиальной клетки субъекта.

163. Способ по п.140, в котором доставка гетерологичного груза происходит in vivo из кишечника субъекта в супрануклеарную область внутри эпителиальной клетки субъекта.

164. Способ по любому из пп. 141-144, в котором взаимодействие носителя с одним или более элементами из рибофилина 1, SEC24, CK-8, TMEM132, GRP75, ERGIC-53 и перлекана или их комбинацией происходит in vivo на апикальной поверхности эпителиальной клетки субъекта, во внутренней части эпителиальной клетки субъекта или представляет собой их комбинацию.

165. Способ по любому из пп. 145-150 или 161-164, при этом субъектом является грызун или человек.

166. Способ по любому из пп. 145-150 или 161-165, причем эпителиальной клеткой является поляризованная эпителиальная клетка.

167. Способ по п.166, причем поляризованной эпителиальной клеткой является поляризованная эпителиальная клетка кишечника.

168. Способ по любому из пп. 145-150, дополнительно включающий составление

конструкции доставки для введения субъекту.

169. Способ по п.168, причем состав содержит один или более фармацевтически приемлемых носителей.

170. Способ по любому из пп. 168-169, причем конструкция доставки составлена для перорального введения, местного введения, легочного введения, интраназального введения, буккального введения, сублингвального введения или введения в глаза.

171. Способ по любому из пп. 168-170, причем композиция составлена для перорального введения.

172. Способ по любому из пп. 145-150, причем заболеванием является воспалительное заболевание, аутоиммунное заболевание, рак, нарушение обмена веществ, жировая болезнь печени или нарушение роста из-за дефицита гормона роста.

173. Способ по п.172, причем воспалительным заболеванием является воспалительное заболевание кишечника, псориаз или бактериальный сепсис.

174. Способ по п.173, причем воспалительным заболеванием кишечника является болезнь Крона, язвенный колит, коллагенозный колит, лимфоцитарный колит, ишемический колит, диверсионный колит, синдром Бехчета или неопределенный колит.

175. Способ по п.172, причем аутоиммунным заболеванием является системная красная волчанка (SLE), вульгарная пузырчатка, миастения гравис, гемолитическая анемия, тромбоцитопеническая пурпура, болезнь Грейвса, болезнь Шегрена, дерматомиозит, болезнь Хашимото, полимиозит, воспалительное заболевание кишечника, рассеянный склероз (MS), сахарный диабет, ревматоидный артрит или склеродермия.

176. Способ по п.172, причем раком является неходжкинская лимфома, лимфома Ходжкина, хроническая лимфоцитарная лейкемия, волосатоклеточный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, множественная миелома, карцинома мочевого пузыря, почки, яичника, шейки матки, молочной железы, легкого, носоглотки, злокачественная меланома, резистентная к ритуксимабу NHL или лейкемия.

177. Способ по п.172, причем нарушением обмена веществ является диабет, ожирение, диабет вследствие ожирения, гипергликемия, дислипидемия, гипертриглицеридемия, синдром X, инсулинорезистентность, нарушение толерантности к глюкозе (IGT), диабетическая дислипидемия или гиперлипидемия.

178. Способ по любому из пп. 136-148, причем носителем является малая молекула.

179. Способ по любому из пп. 136-148, причем носителем является полипептид.

180. Способ по п.179, причем полипептидом является антитело или его функциональный фрагмент.

181. Способ по любому из пп. 136-148, причем носителем является аптамер.

182. Способ по любому из пп. 136-148 или 178-181, причем носитель получен из экзотоксина.

183. Способ по п.182, причем носитель получен из домена I экзотоксина и не имеет домена II, домена Ib и домен III экзотоксина.

184. Способ по любому из пп. 149-150 или 183, причем носитель, который получен

из домена I экзотоксина, содержит аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью домена I экзотоксина или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, причем экзотоксин представляет собой токсин Cholix или экзотоксин A Pseudomonas.

185. Способ по п.184, в котором носитель содержит по меньшей мере 130 аминокислотных остатков домена I экзотоксина.

186. Способ по любому из пп. 184-185, в котором носитель содержит по меньшей мере 150 смежных аминокислотных остатков домена I экзотоксина.

187. Способ по любому из пп. 184-186, причем носитель, у которого отсутствует домен II и домен III экзотоксина, содержит часть домена II или домена III экзотоксина или их комбинацию.

188. Способ по п.187, причем часть содержит не более 82 аминокислотных остатков домена II или домена III экзотоксина.

189. Способ по любому из пп. 184-188, причем экзотоксин представляет собой токсин Cholix.

190. Способ по любому из пп. 184-189, в котором носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

191. Способ по п.190, в котором носитель включает делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

192. Способ по п.190, в котором носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 90% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

193. Способ по п.190, в котором носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

194. Способ по п.190, в котором носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4

или SEQ ID NO: 5 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

195. Способ по п.190, в котором носитель содержит:

аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом, и

не более 347 смежных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1.

196. Способ по п.195, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или ее функциональный фрагмент.

197. Способ по п.195, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или SEQ ID NO: 7 или ее функциональный фрагмент.

198. Способ по п.195, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 9 или ее функциональный фрагмент.

199. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

200. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

201. Способ по п.190, в котором носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-187 или 1-206 SEQ ID NO: 5 или один или более аминокислотных остатков 1-186 или 1-205 SEQ ID NO: 4.

202. Способ по п.190, в котором носитель содержит остатки 1-187 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-186 SEQ ID NO: 4 и не более 206 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

203. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

204. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11 или ее функциональный фрагмент.

205. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или

аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

206. Способ по п.190, в котором носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-151 или 1-187 SEQ ID NO: 5 или одного или более аминокислотных остатков 1-150 или 1-186 SEQ ID NO: 4.

207. Способ по п.190, в котором у носителя отсутствует любой один или более аминокислотных остатков 1-39 SEQ ID NO: 5 или остатков 1-38 SEQ ID NO: 4.

208. Способ по п.207, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69 или SEQ ID NO: 70 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

209. Способ по п.190, в котором носитель содержит остатки 1-151 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-150 SEQ ID NO: 4 и не более 187 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

210. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 30 - SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

211. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30 или SEQ ID NO: 31 или ее функциональный фрагмент.

212. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 124 или SEQ ID NO: 125 или аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

213. Способ по п.190, в котором носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-151 SEQ ID NO: 5 или одного или более аминокислотных остатков 1-150 SEQ ID NO: 4.

214. Способ по п.190, в котором носитель содержит остатки 1-134 SEQ ID NO: 5 или остатки 1-133 SEQ ID NO: 4 и не более 151 смежных аминокислотных остатков SEQ ID NO: 1.

215. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 106 - SEQ ID NO: 125 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

216. Способ по п.190, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106 или SEQ ID NO: 107 или ее функциональный фрагмент.

217. Способ по любому из пп. 206-216, в котором носитель содержит по меньшей мере одну, но не более 20 бета цепей.

218. Способ по п.182, причем конструкция доставки содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 156 или SEQ ID NO: 158 - SEQ ID NO: 165 или по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

219. Способ по любому из пп. 184-188, причем экзотоксином является экзотоксин A Pseudomonas.

220. Способ по п.219, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 80% идентичность с ее функциональным фрагментом.

221. Способ по п.220, в котором носитель содержит делецию или мутацию одного или более аминокислотных остатков 1-252 SEQ ID NO: 137.

222. Способ по п.220, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 95% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

223. Способ по п.220, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

224. Способ по п.220, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью 1-252 SEQ ID NO: 137 или 100% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

225. Способ по п.220, в котором носитель содержит остатки 1-252 SEQ ID NO: 135.

226. Способ по любому из пп. 136-148, в котором носитель содержит первую часть и вторую часть, причем первую часть получают из первого экзотоксина, а вторую часть получают из второго экзотоксина.

227. Способ по п.226, в котором первым экзотоксином является Cholix, а вторым экзотоксином является PE.

228. Способ по любому из пп. 226-227, причем первую часть получают из домена I, домена II, домена Ib или домена III Cholix или любых их комбинаций.

229. Способ по любому из пп. 226-228, причем первая часть содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 125, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

230. Способ по любому из пп. 226-229, причем первая часть содержит

аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 148 - SEQ ID NO: 152, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

231. Способ по любому из пп. 226-230, причем первая часть содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 11, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

232. Способ по любому из пп. 226-231, в котором вторая часть получена из домена I, домена II, домена Ib или домена III PE или любых их комбинаций.

233. Способ по любому из пп. 226-232, в котором вторая часть содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с любой из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 137 - SEQ ID NO: 145, ее функциональный фрагмент или любые их комбинации.

234. Способ по любому из пп. 226-233, в котором первая часть химически соединена или рекомбинантно соединена со второй частью.

235. Способ по любому из пп. 226-234, в котором первая часть прямо или непрямо соединена со второй частью.

236. Способ по любому из пп. 226-234, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 146 или SEQ ID NO: 147.

237. Способ по любому из пп. 183-236, в котором носитель дополнительно содержит по меньшей мере один N-концевой метиониновый остаток.

238. Способ по п.237, в котором носитель содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичность последовательностей с аминокислотной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 125 или 80% идентичность последовательностей с ее функциональным фрагментом.

239. Способ по любому из пп. 136-238, причем конструкция доставки образует мультимер.

240. Способ по п.239, в котором мультимер образован путем мультимеризации гетерологичного груза.

241. Способ по любому из пп. 239-240, в котором мультимер представляет собой гетеромер или гомомер.

242. Способ по п.241, в котором гомомер представляет собой гомодимер.

243. Способ по любому из пп. 239-242, в котором гомодимер образован путем димеризации гетерологичного груза.

244. Способ по любому из пп. 136-243, в котором носитель химически соединен или рекомбинантно соединен с гетерологичным грузом.

245. Способ по любому из пп. 136-244, в котором носитель ковалентно соединен с гетерологичным грузом.

246. Способ по любому из пп. 183-237, в котором гетерологичный груз соединен с С-концом носителя.

247. Способ по любому из пп. 183-237, в котором гетерологичный груз соединен с N-концом носителя.

248. Способ по любому из пп. 136-247, в котором носитель соединен прямо с гетерологичным грузом.

249. Способ по любому из пп. 136-247, в котором носитель непрямо соединен с гетерологичным грузом.

250. Способ по п.249, в котором носитель соединен с гетерологичным грузом посредством спейсера.

251. Способ по п.250, в котором спейсер представляет собой аминокислотный спейсер.

252. Способ по п.251, в котором аминокислотный спейсер содержит один или более глициновых остатков и один или более сериновых остатков.

253. Способ по любому из пп. 250-251, в котором аминокислотный спейсер имеет от 1 до 50 аминокислотных остатков в длину.

254. Способ по любому из пп. 251-253, в котором спейсер представляет собой расщепляемый спейсер.

255. Способ по п.254, в котором расщепляемый спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбираемую из группы, состоящей из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 174 - SEQ ID NO: 206.

256. Способ по любому из пп. 251-253, в котором спейсер представляет собой нерасщепляемый спейсер.

257. Способ по п.256, в котором нерасщепляемый спейсер содержит одну или несколько аминокислотных последовательностей GTGGS (SEQ ID NO: 207), GGGGS (SEQ ID NO: 208), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 209), GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 210) или GGGGSGGG (SEQ ID NO: 211).

258. Способ по любому из пп. 256-257, в котором нерасщепляемый спейсер содержит одну или несколько $(GGGGS)_x$ (SEQ ID NO: 212), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

259. Способ по любому из пп. 256-258, в котором нерасщепляемый спейсер содержит одну или несколько $(GS)_x$ (SEQ ID NO: 213), где x=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

260. Способ по любому из пп. 251-253, в котором спейсер представляет собой один или более фрагментов домена II, домена Ib или домена III экзотоксина или их комбинаций.

261. Способ по п.260, в котором спейсер содержит не более 82 аминокислотных остатков домена II, 82 аминокислотных остатков домена III или их комбинацию.

262. Способ по любому из пп. 136-261, в котором гетерологичным грузом является

макромолекула, малая молекула, полипептид, нуклеиновая кислота, мРНК, микроРНК, кшРНК, миРНК, антисмысловая молекула, антитело, ДНК, плазмида, вакцина, полимер, наночастица или каталитически активный материал.

263. Способ по любому из пп. 136-262, в котором гетерологичным грузом является биологически активный груз.

264. Способ по п.263, в котором биологически активным грузом является цитокин, гормон, терапевтическое антитело, его функциональный фрагмент или любые их комбинации.

265. Способ по п.264, в котором цитокином является IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29 или IL-30.

266. Способ по любому из пп. 264-265, в котором цитокин имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 217 или SEQ ID NO: 218.

267. Способ по п.264, в котором гормон имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 215 или SEQ ID NO: 216.

268. Способ по п.264, в котором терапевтическим антителом является антитело против TNFa.

269. Способ по п.268, в котором антителом против TNFa является адалимумаб или инфликсимаб.

270. Способ по любому из пп. 136-262, в котором гетерологичным грузом является обнаруживаемое средство.

271. Способ по п.270, в котором обнаруживаемым средством является флуорофор, контрастное средство, рентгеноконтрастное средство, PET средство, наночастица или радиоизотоп.

272. Способ по любому из пп. 270-271, в котором флуорофором является красный флуоресцентный белок (RFP).

273. Способ по п.272, в котором RFP имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 220.

274. Применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения воспалительного заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

275. Применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения аутоиммунного заболевания у нуждающегося в этом субъекта.

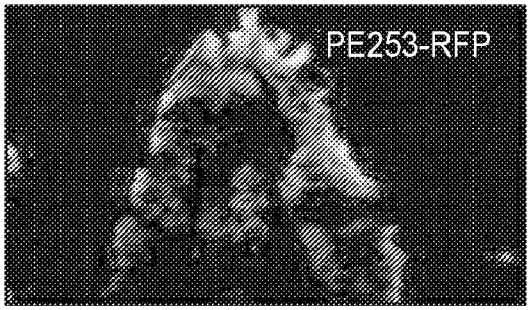
276. Применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения рака у нуждающегося в этом субъекта.

277. Применение не существующей в природе конструкции доставки согласно

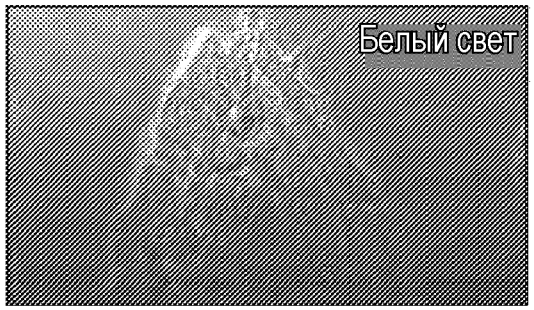
настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения нарушения обмена веществ у нуждающегося в этом субъекта.

278. Применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения жировой болезни печени у нуждающегося в этом субъекта.

279. Применение не существующей в природе конструкции доставки согласно настоящему раскрытию для получения лекарственного средства для лечения, профилактики и/или предотвращения нарушения роста из-за дефицита GH у нуждающегося в этом субъекта.



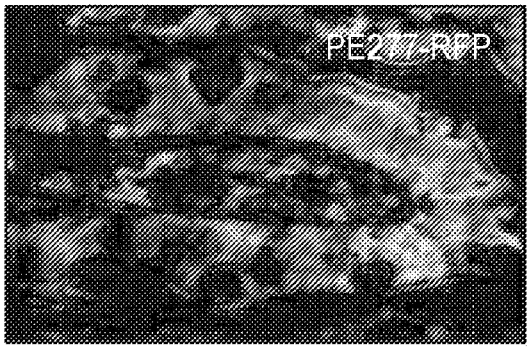
ФИГ.1A



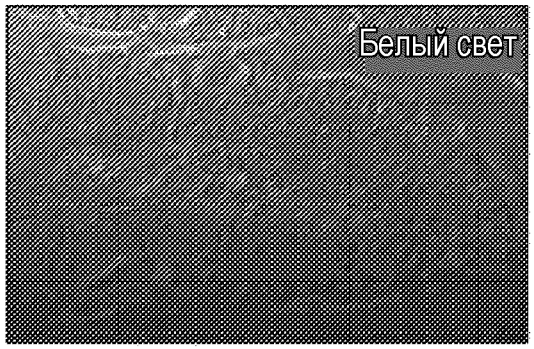
ФИГ.1B

ФИГ.1C

Anti-PE: 1/1,000
AbII: 1/100



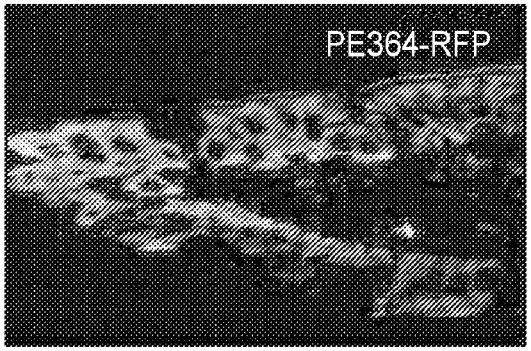
ФИГ.1D



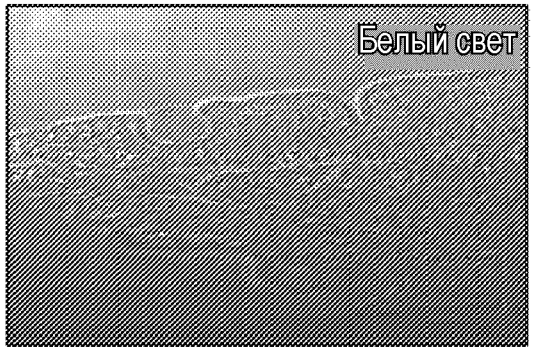
ФИГ.1E

ФИГ.1F

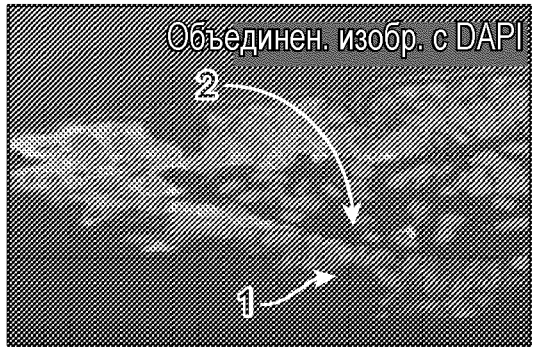
ФИГ.1



ФИГ.1G

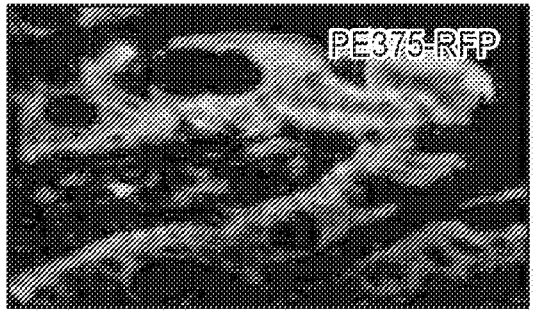


ФИГ.1H

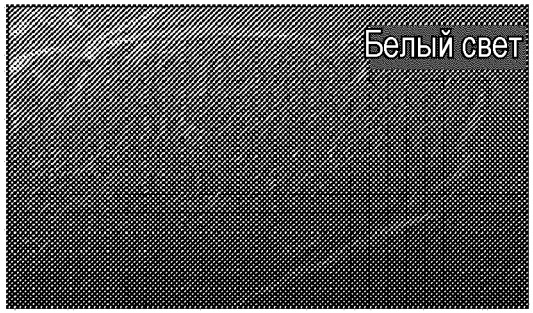


ФИГ.1I

565275



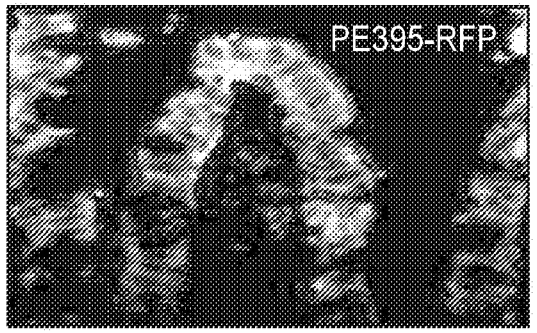
ФИГ.2A



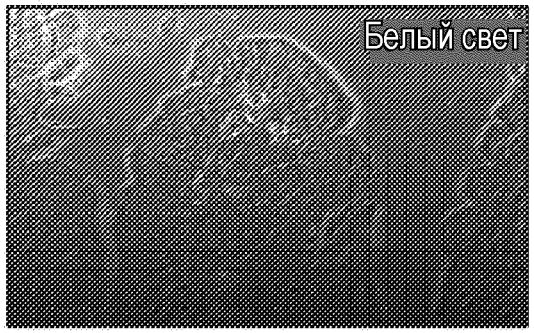
ФИГ.2B

ФИГ.2C

Anti-PE: 1/1,000
AbII: 1/100



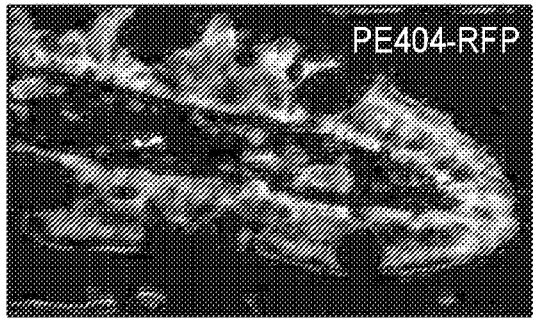
ФИГ.2D



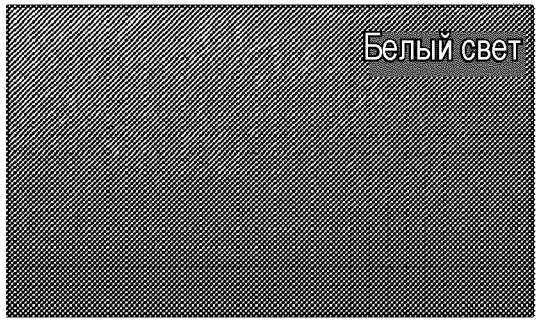
ФИГ.2E

ФИГ.2F

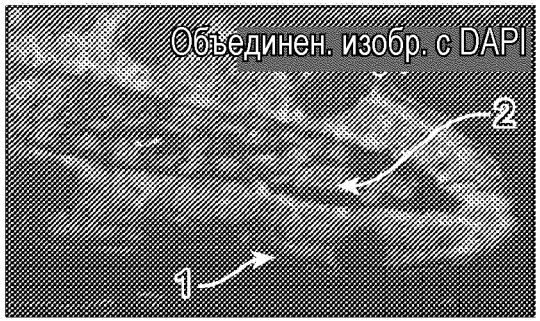
ФИГ.2



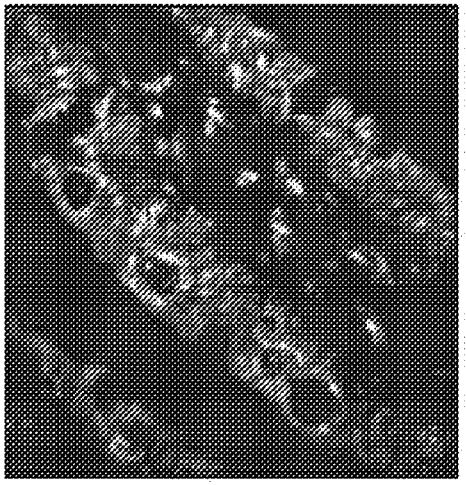
ФИГ.2G



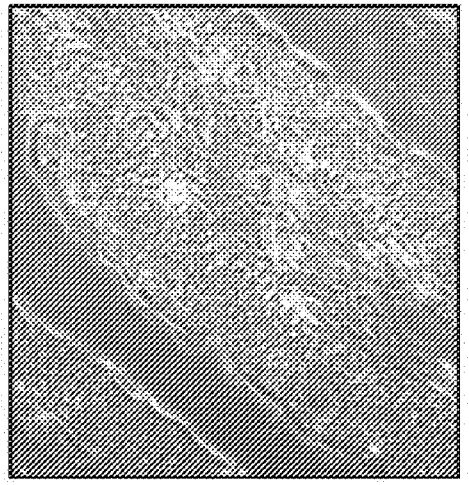
ФИГ.2H



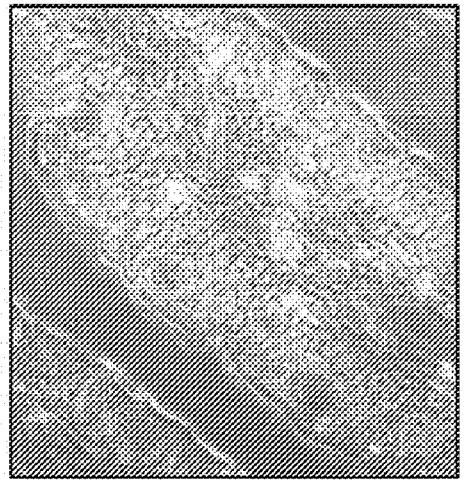
ФИГ.2I



ФИГ.3A

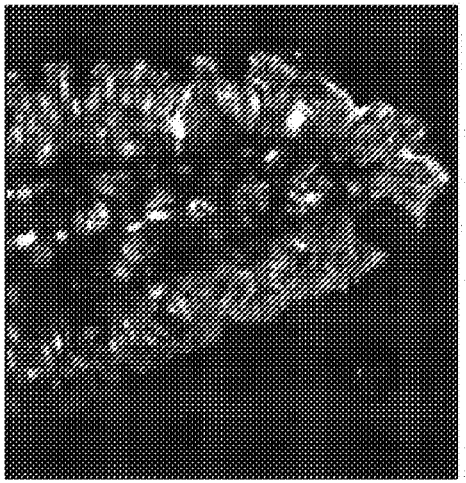


ФИГ.3B

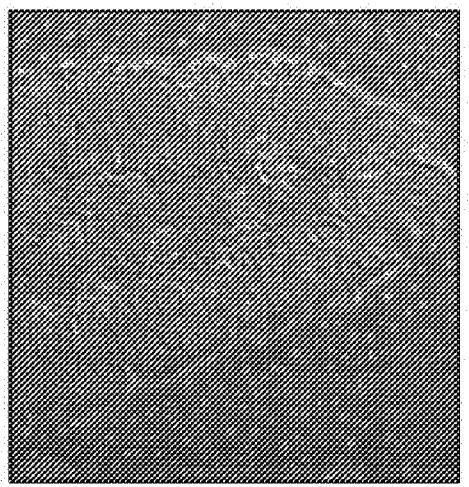


ФИГ.3C

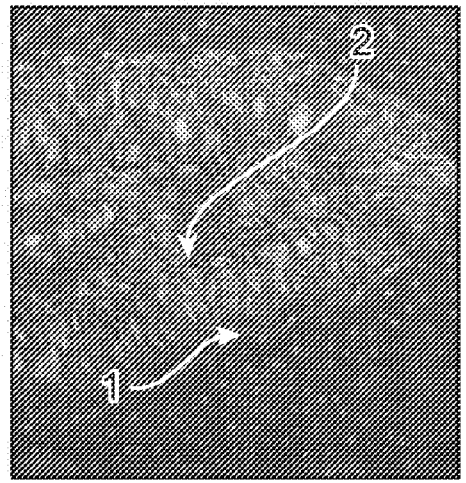
Anti-Cho 1/500



ФИГ.3D



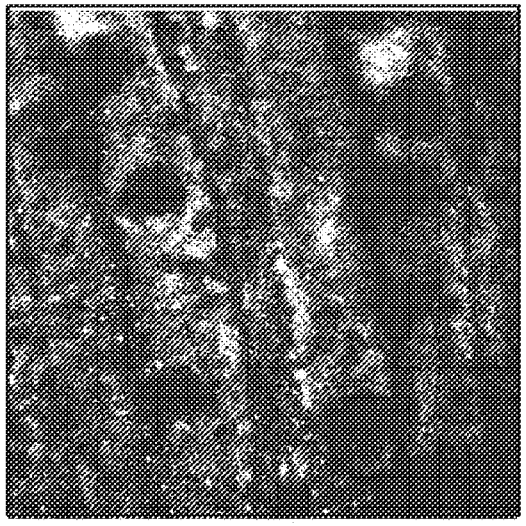
ФИГ.3E



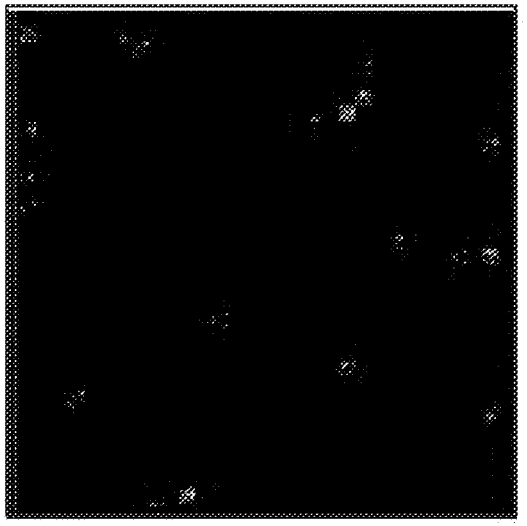
ФИГ.3F

Anti-RPF 1/50

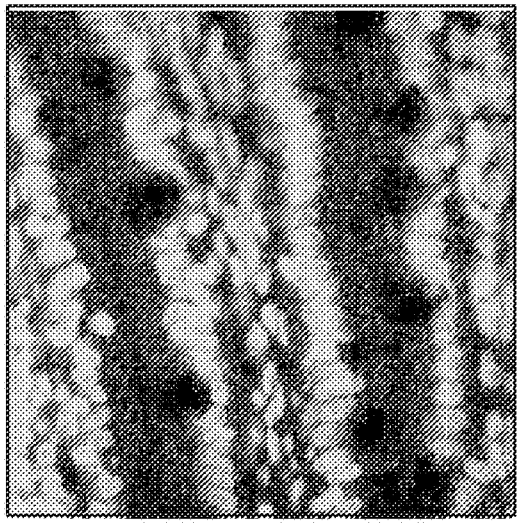
ФИГ.3



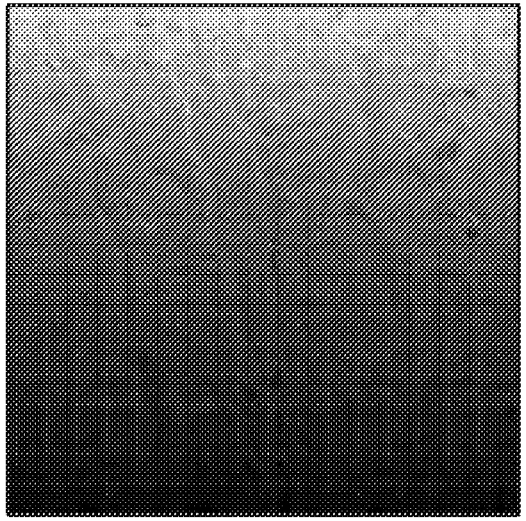
ФИГ.4A



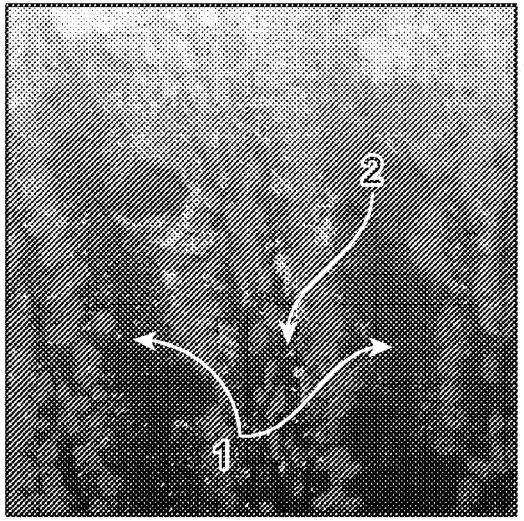
ФИГ.4B



ФИГ.4C

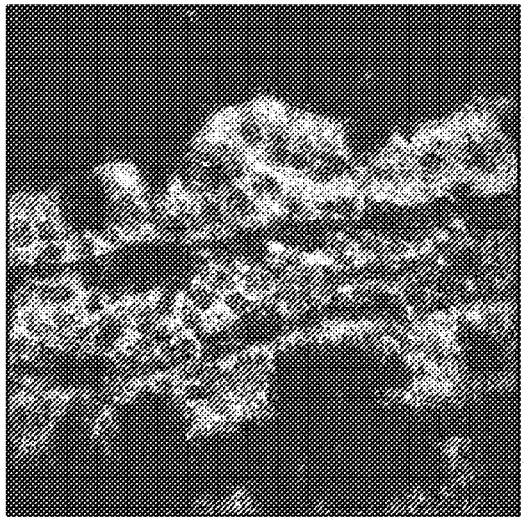


ФИГ.4D

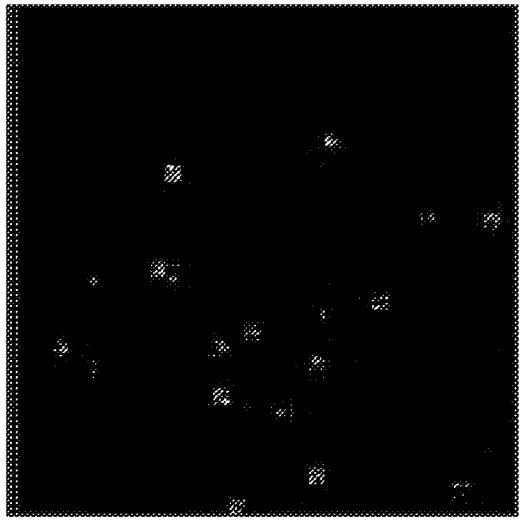


ФИГ.4E

ФИГ.4

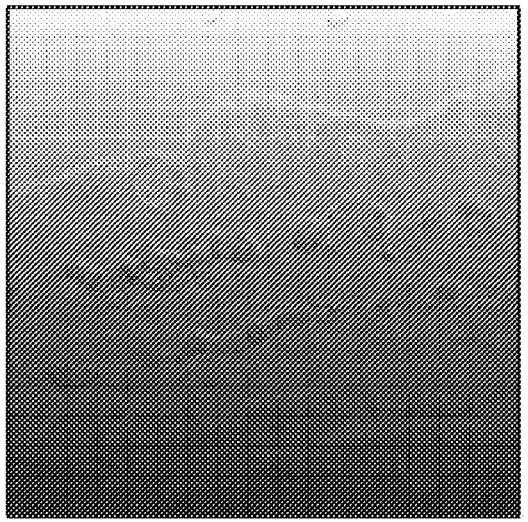


ФИГ.5A

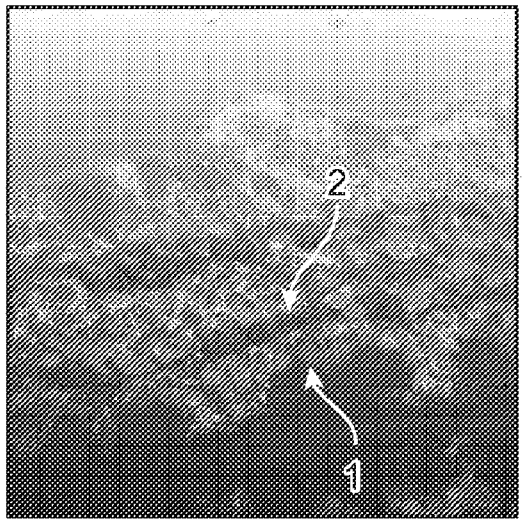


ФИГ.5B

ФИГ.5C



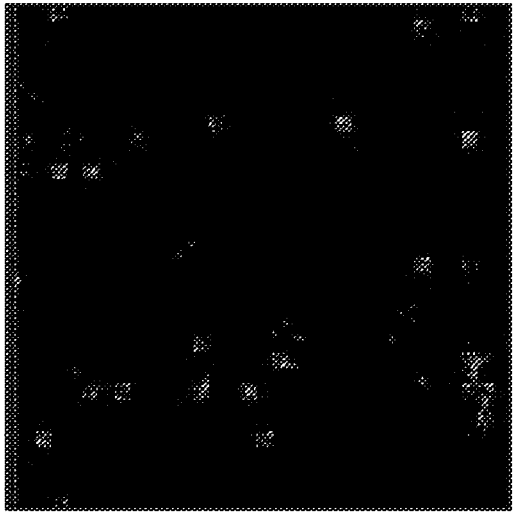
ФИГ.5D



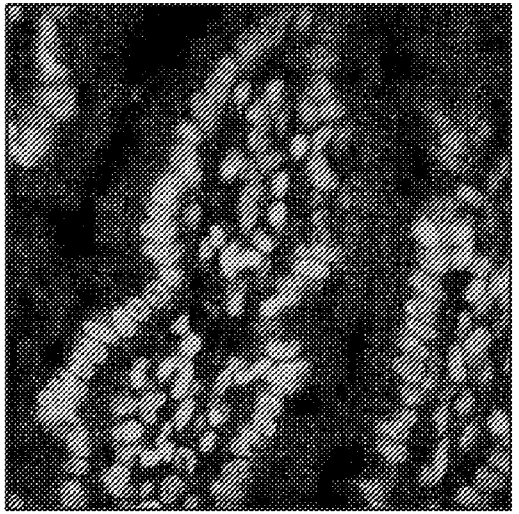
ФИГ.5E

ФИГ.5

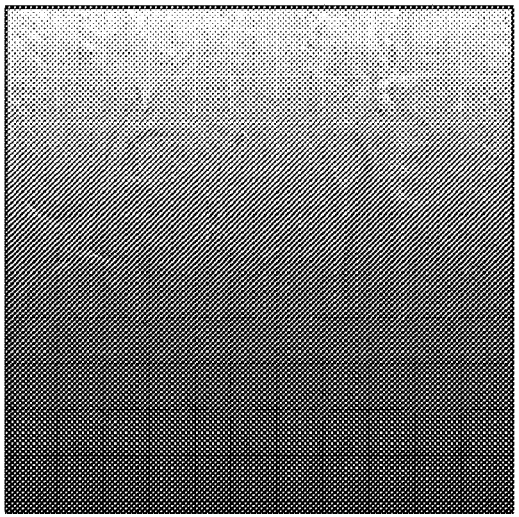
ФИГ.6A



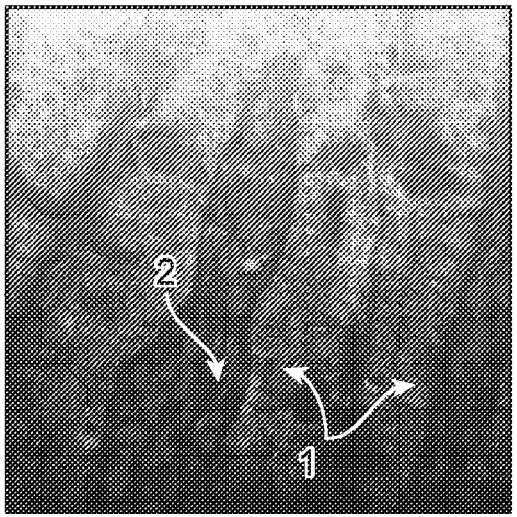
ФИГ.6B



ФИГ.6C

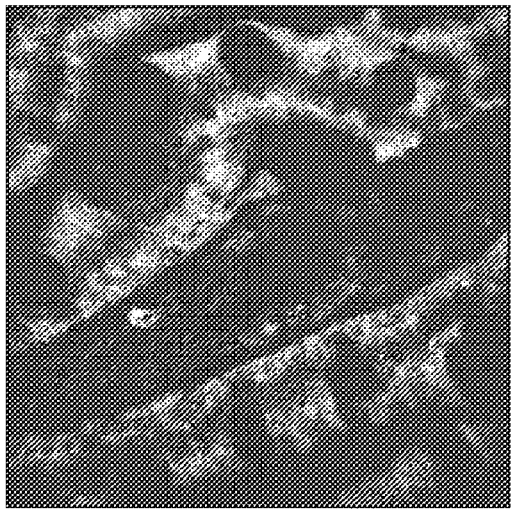


ФИГ.6D

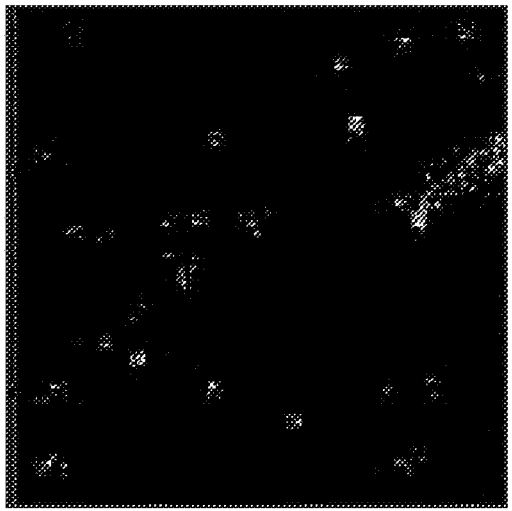


ФИГ.6E

ФИГ.6

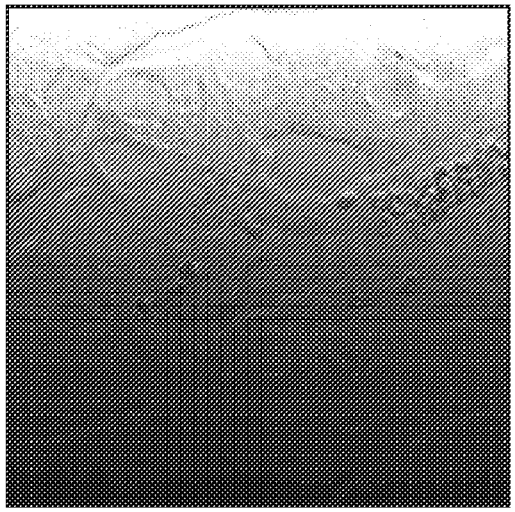


ФИГ.7A

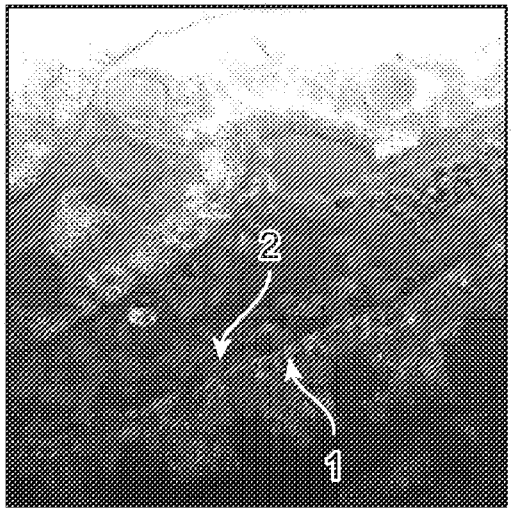


ФИГ.7B

ФИГ.7C

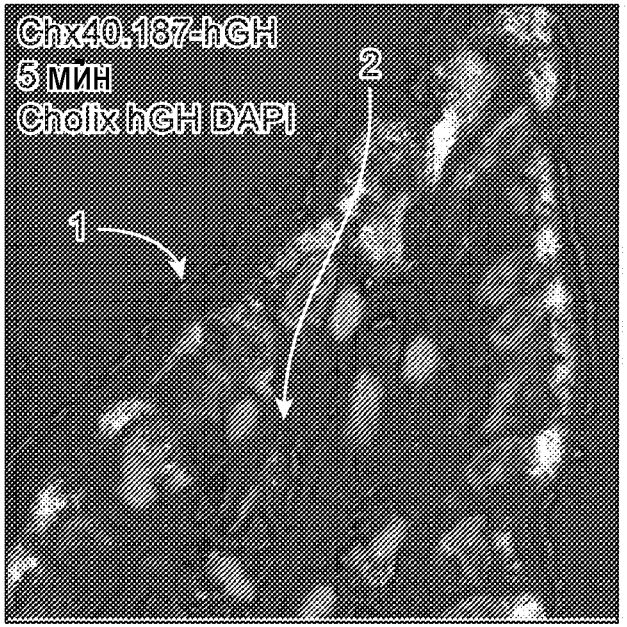


ФИГ.7D

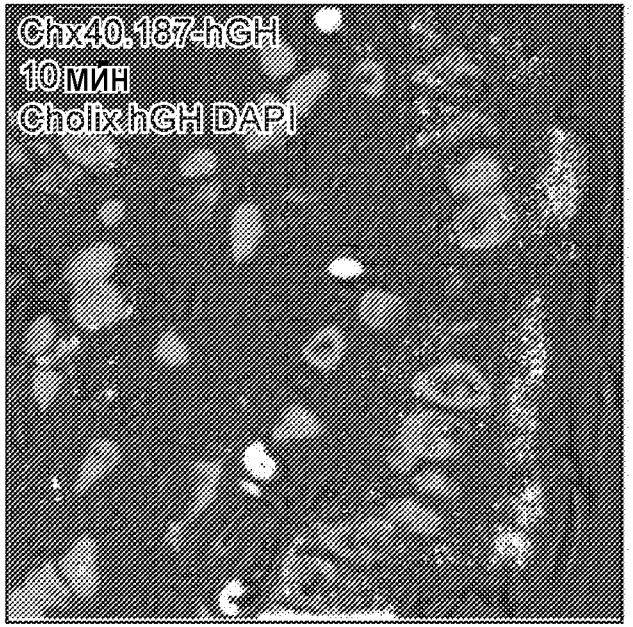


ФИГ.7E

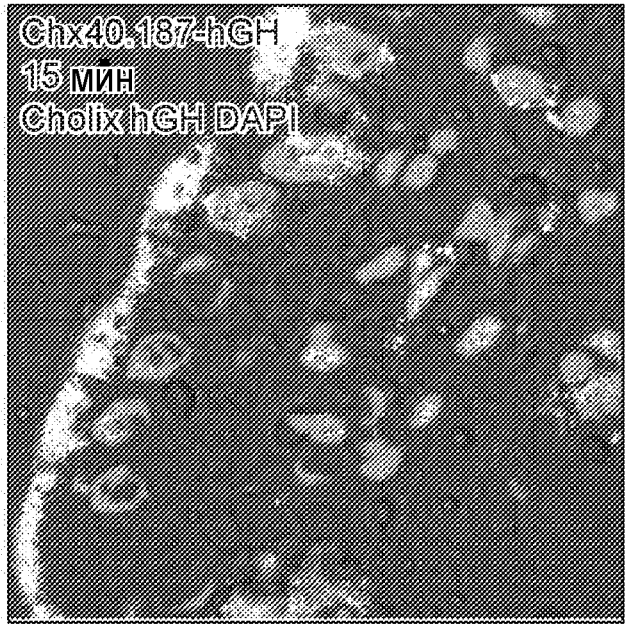
ФИГ.7



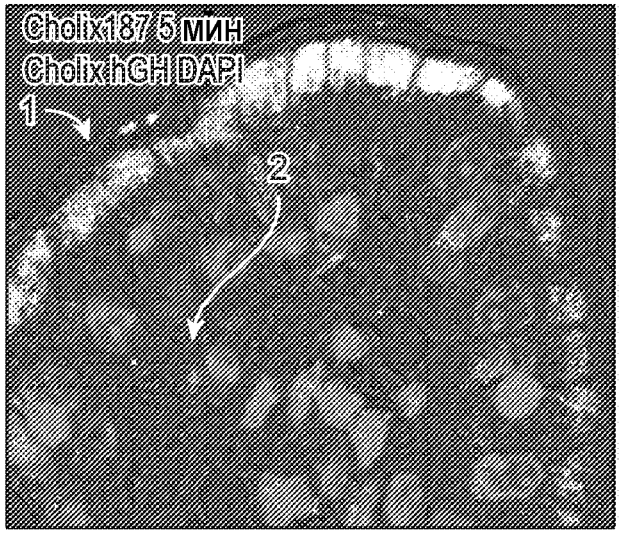
ФИГ.8A



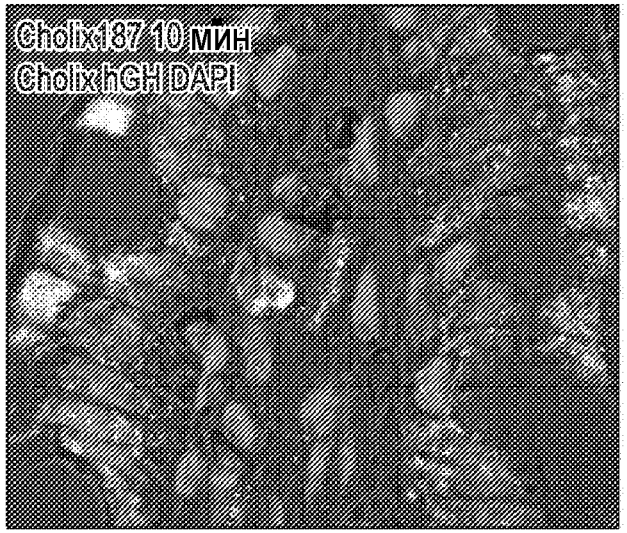
ФИГ.8B



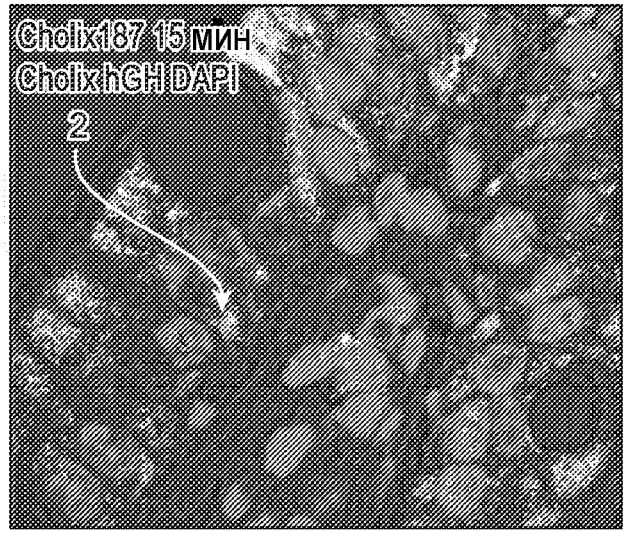
ФИГ.8C



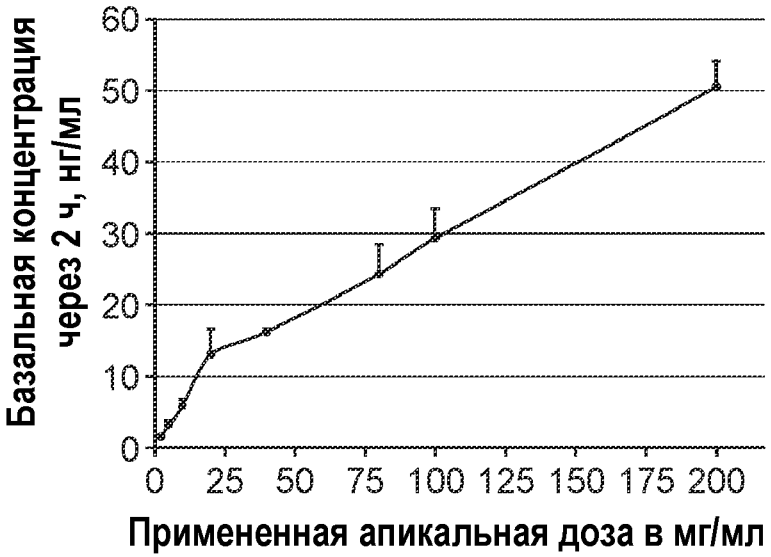
ФИГ.9A



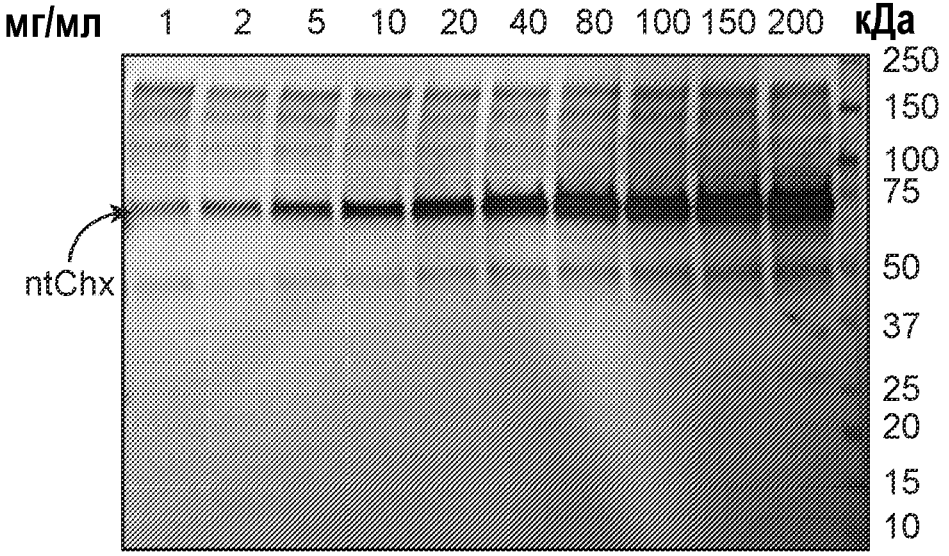
ФИГ.9B



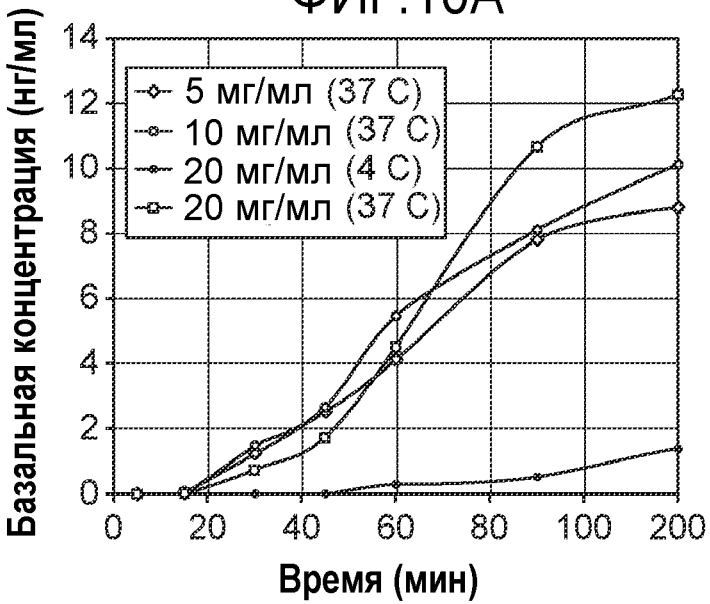
ФИГ.9C



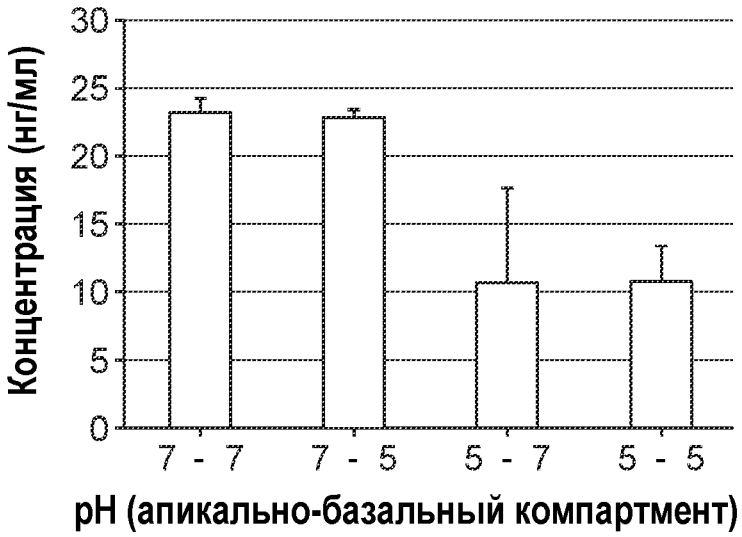
ФИГ.10A



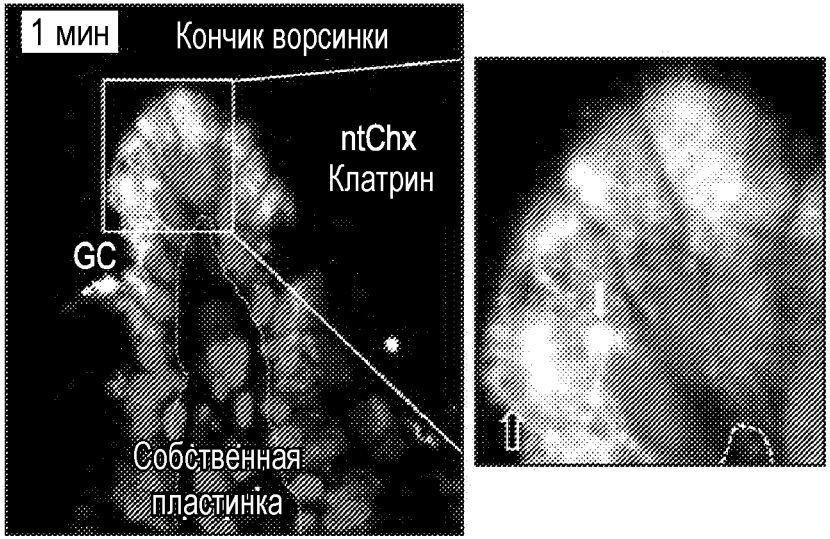
ФИГ.10B



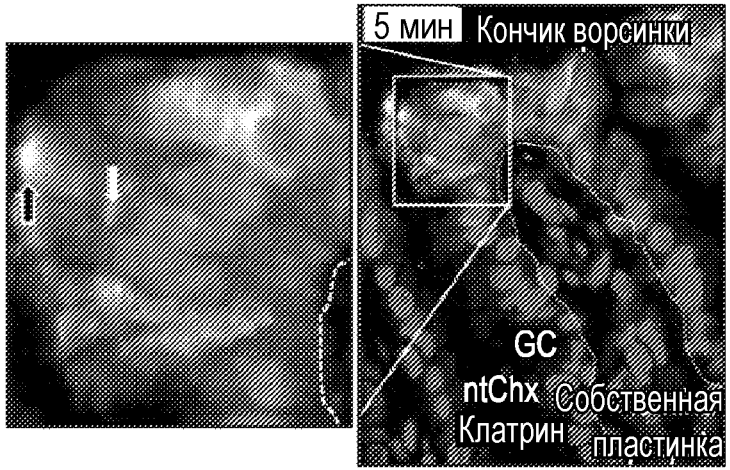
ФИГ.10C



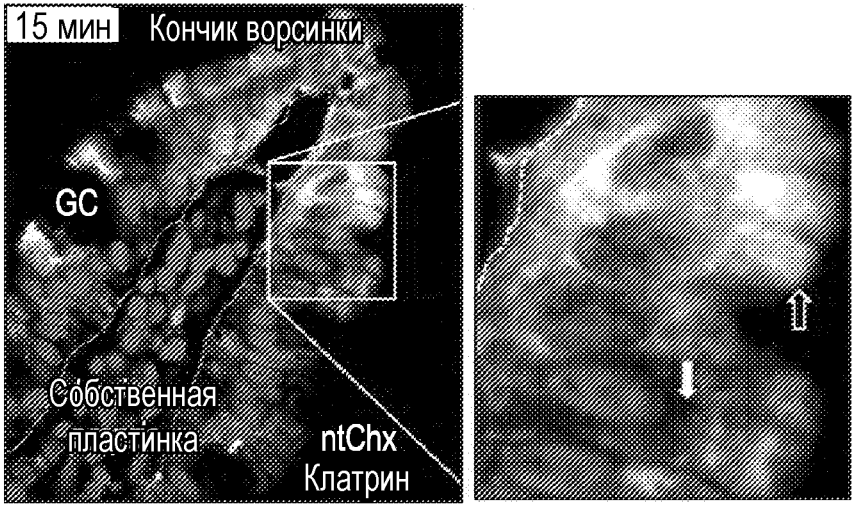
ФИГ.11



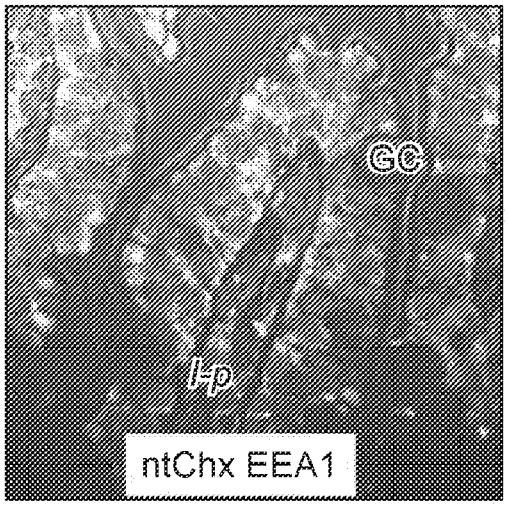
ФИГ.12A



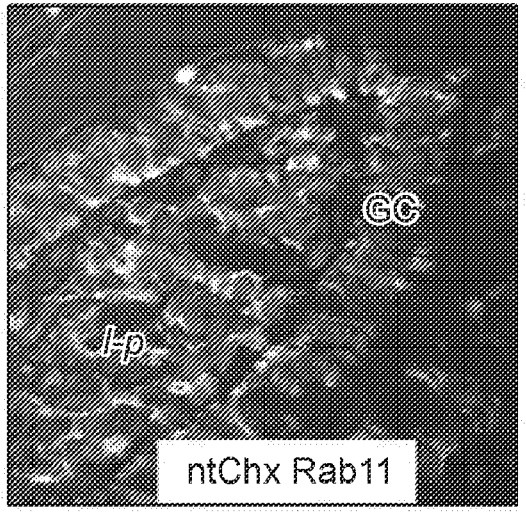
ФИГ.12B



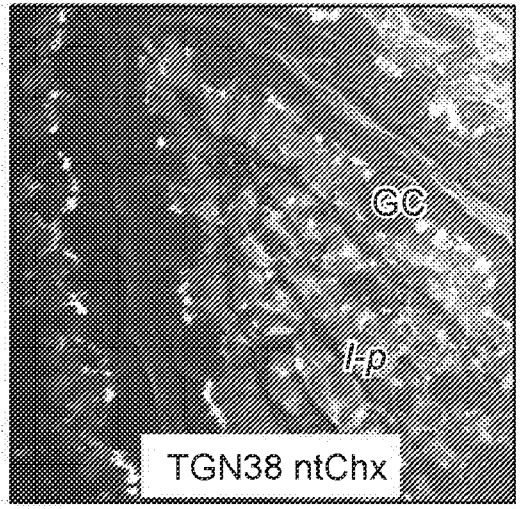
ФИГ.12C



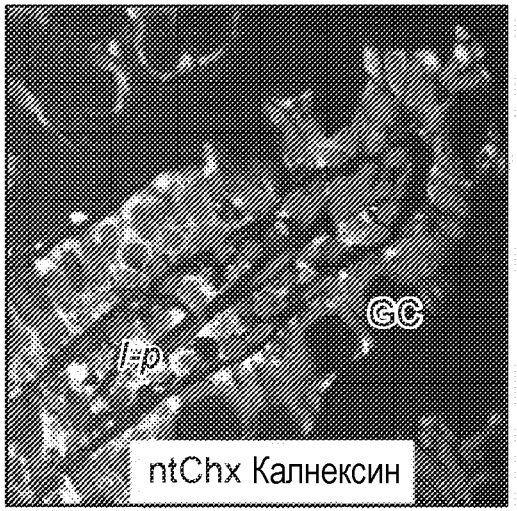
ФИГ.13A



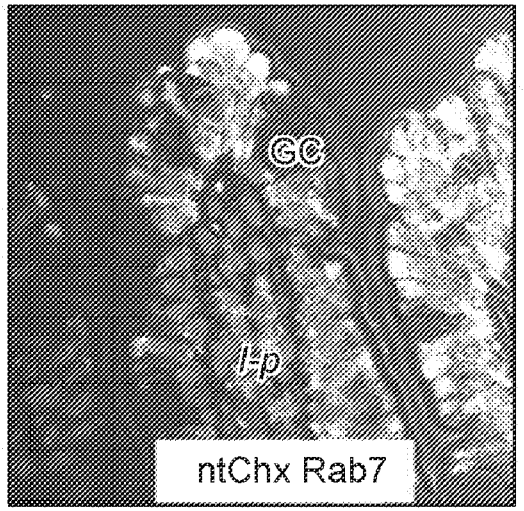
ФИГ.13B



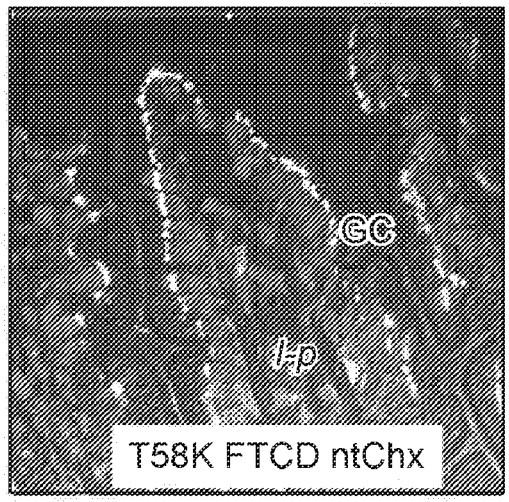
ФИГ.13C



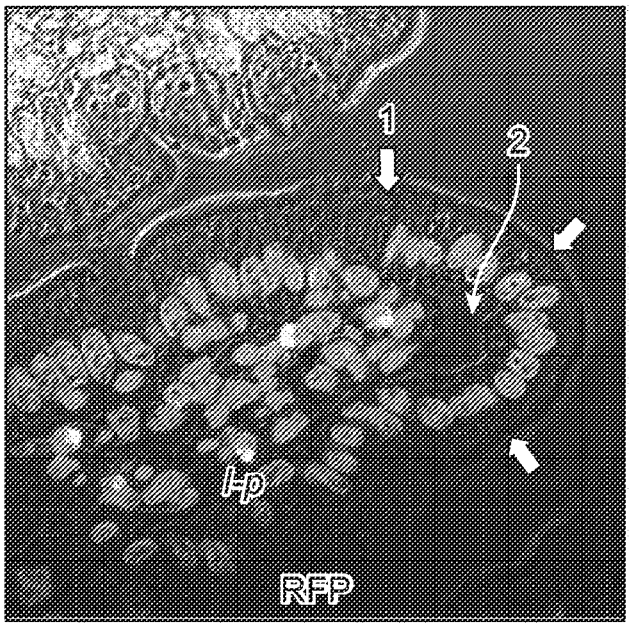
ФИГ.13D



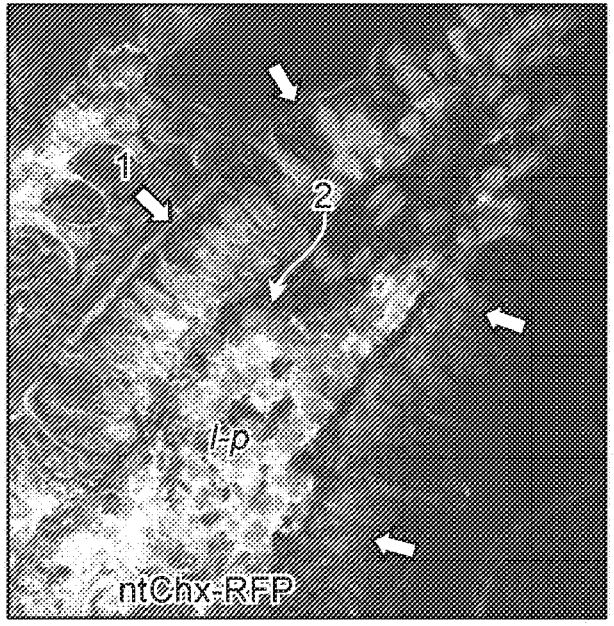
ФИГ.13E



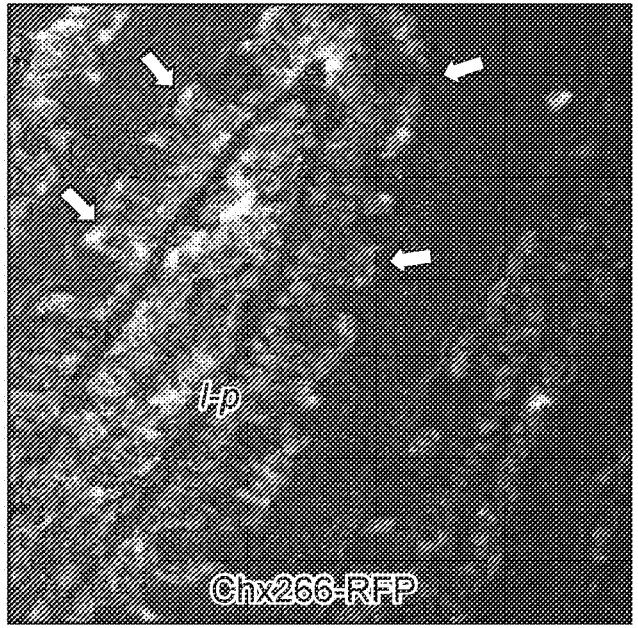
ФИГ.13F



ФИГ.14A

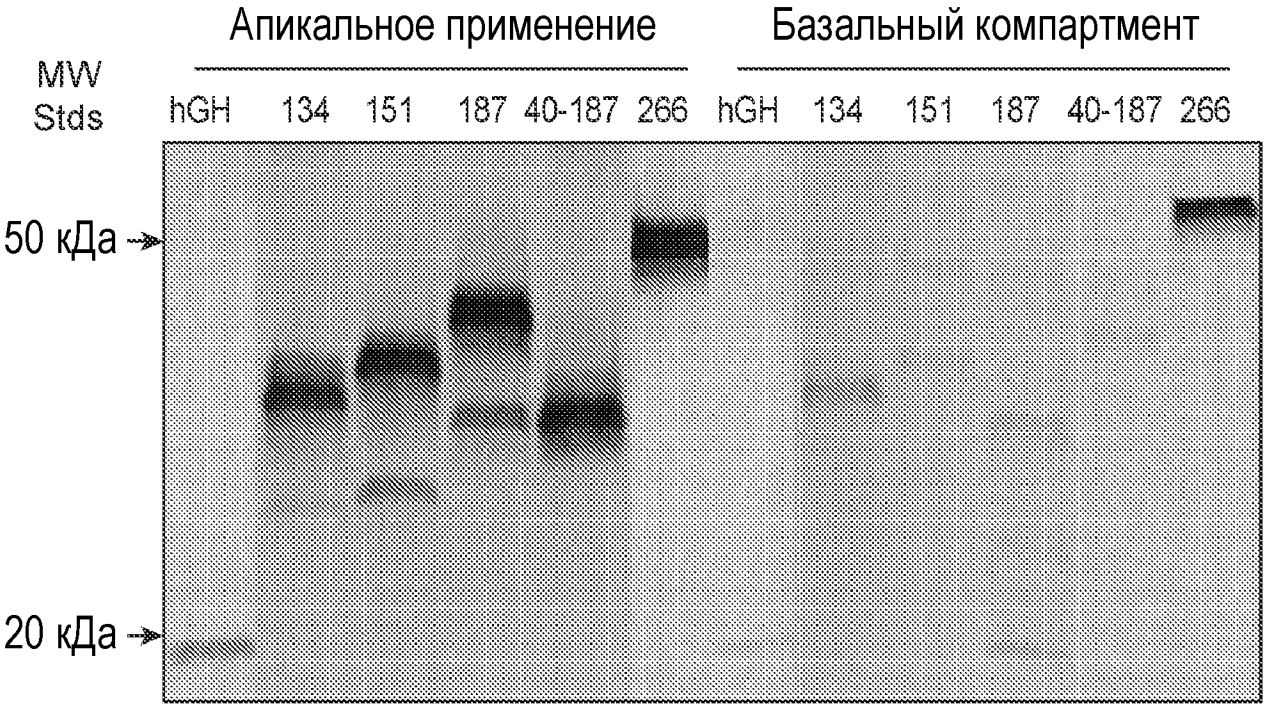


ФИГ.14B

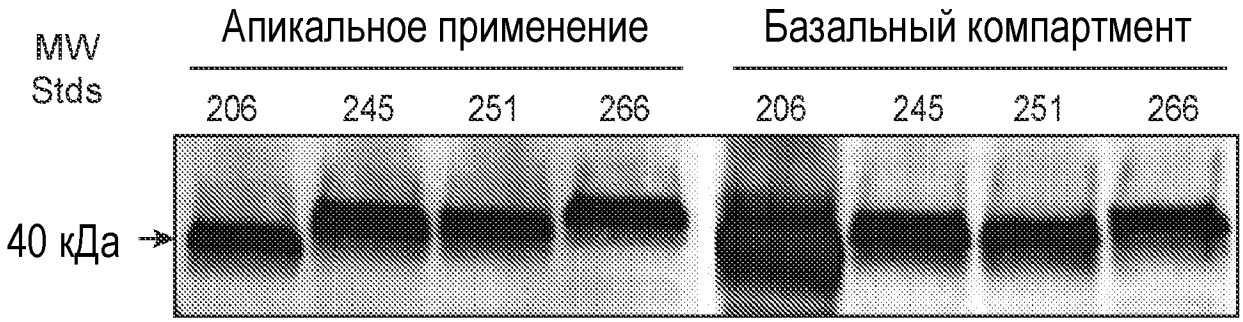


ФИГ.14C

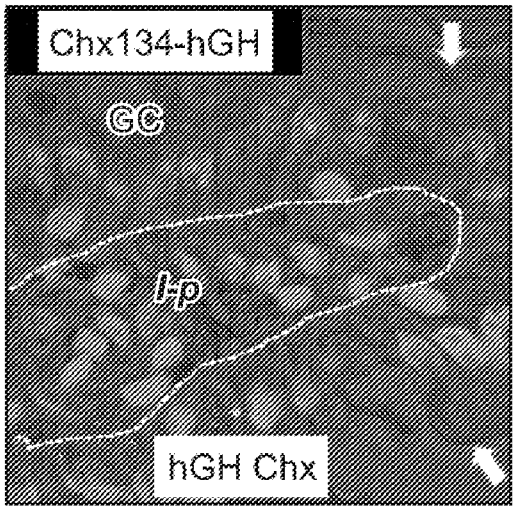
ФИГ.15A



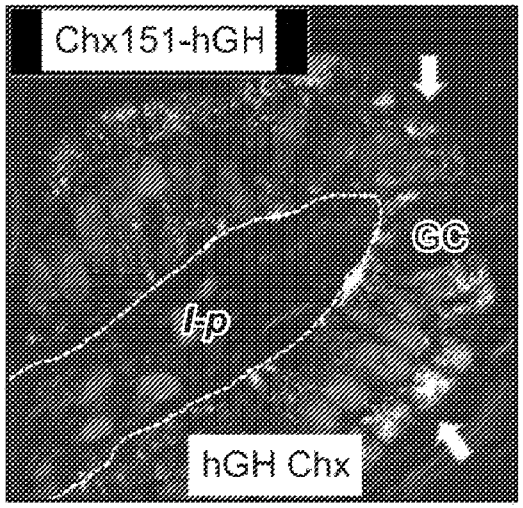
ФИГ.15B



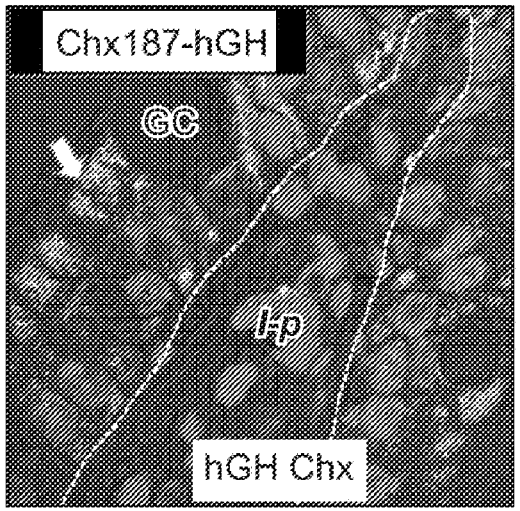
ФИГ.15



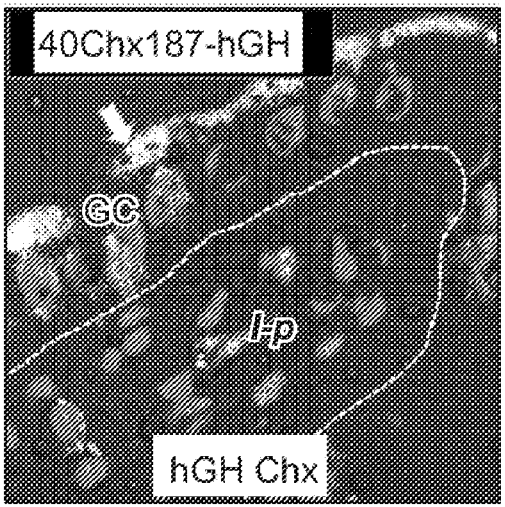
ФИГ.16A



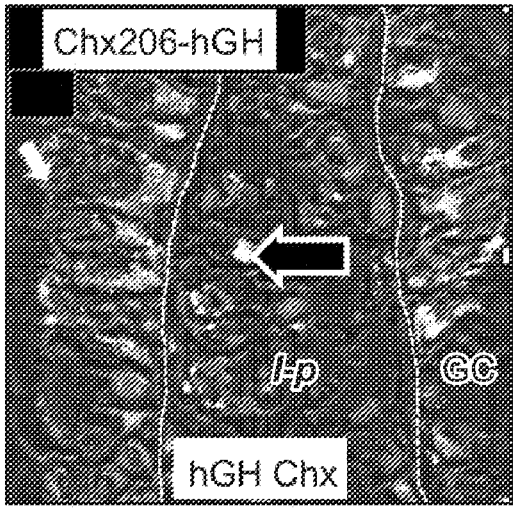
ФИГ.16B



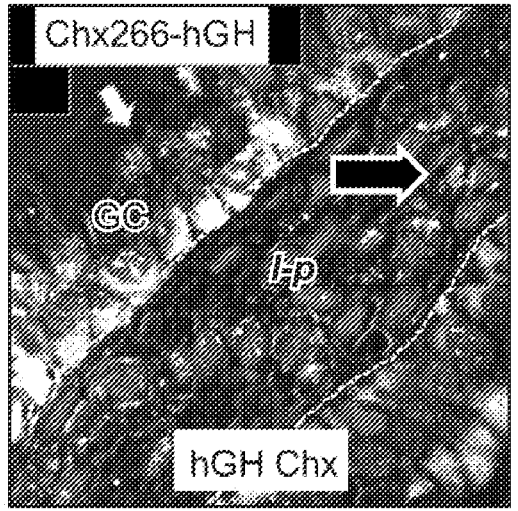
ФИГ.16C



ФИГ.16D

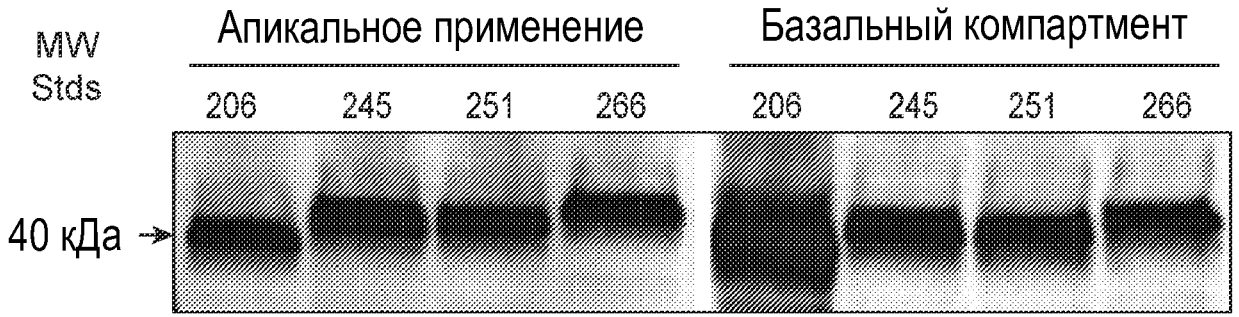


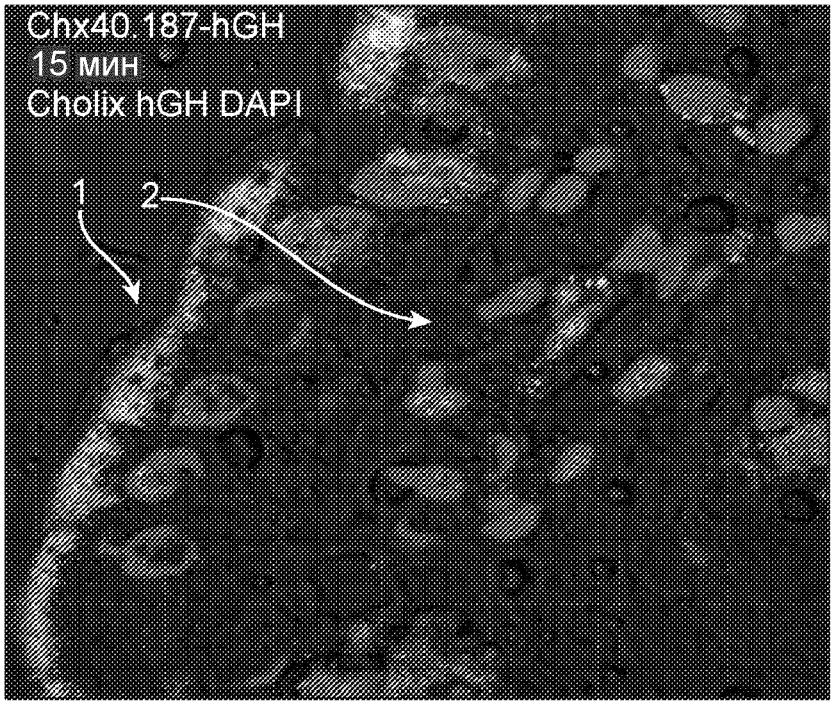
ФИГ.16E

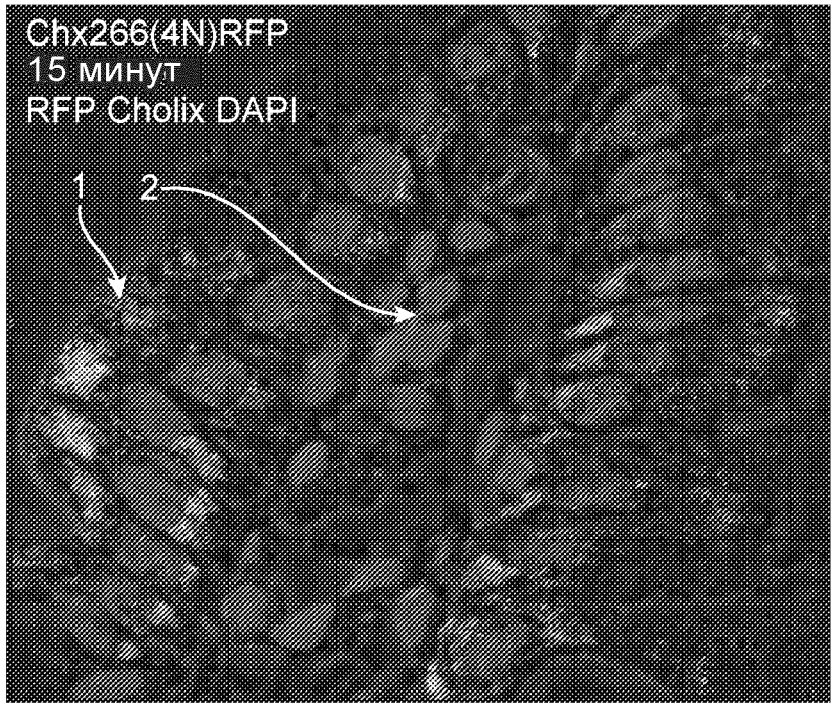


ФИГ.16F

ФИГ.17A







ФИГ.17B

ФИГ.17

ФИГ.17C

ФИГ.18

Домен I Cholix с выделенными критически важными пептидными последовательностями

1-40 MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFAT

134-151 VRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP

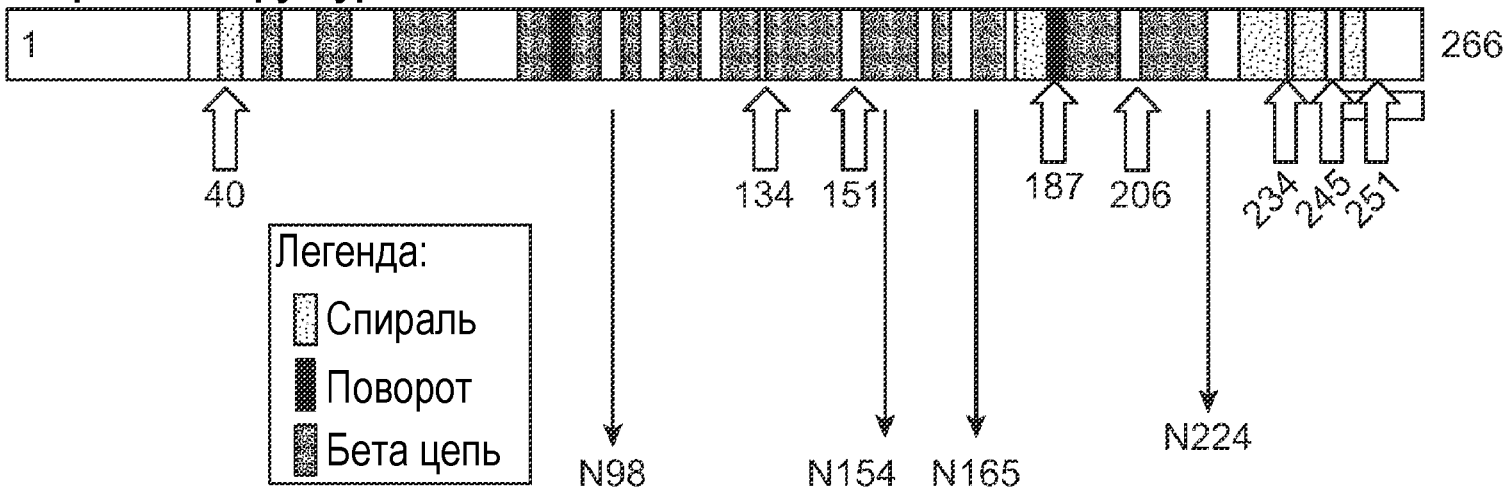
151-186 KLYSIDIDNQTLEQWKIQGNVSFSVIRPEHNIATSWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWTIGLALCWLVP

187-206 MDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGSGGGGSGGG

GS

(SEQ ID NO:221)

Вторичная структура



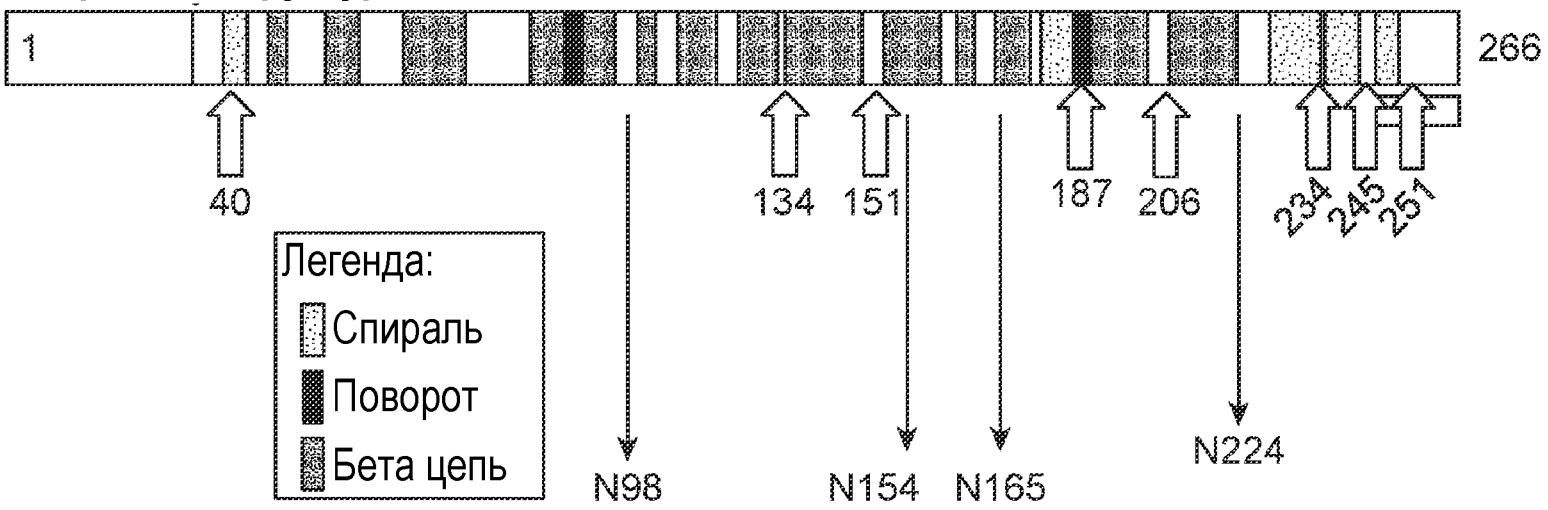
ФИГ.19

Домен I Cholix с линкером $(G_4S)_3$ с маркировкой участков потенциального гликозилирования

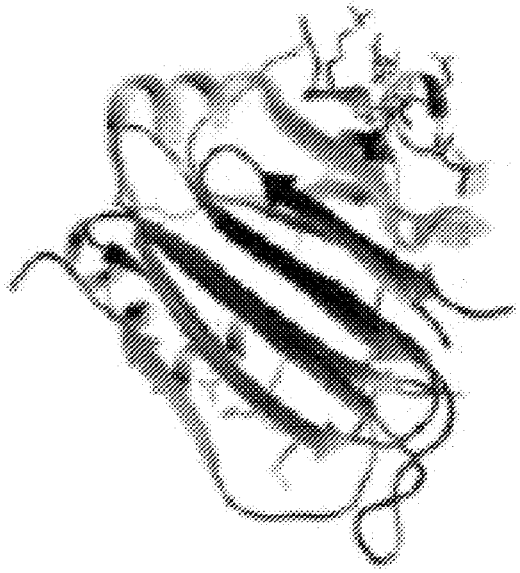
N = участки потенциального гликозилирования

MVEEALNIFDECRSPCSLTPEPGKPIQSKLSIPSDVVLDEGVLYYSMTINDEQNDIKDEDKGESIITIGEFAT
VRATRHYVNQDAPFGVIHLDITTENGTKTYSYNRKEGEFAINWLVPIGEDSPASIKISVDELDQQRNIIEVP
KLYSIDLDNQTLEQWKTQGNVSFSVTRPEHNIAISWPSVSYKAAQKEGSRHKRWAHWHTGLALCWLVP
MDAIYNYITQQNCTLGDNWFGGSYETVAGTPKVITVKQGIEQKPVEQRIHFSKGGGGSGGGGSGGG
GS
(SEQ ID NO: 221)

Вторичная структура



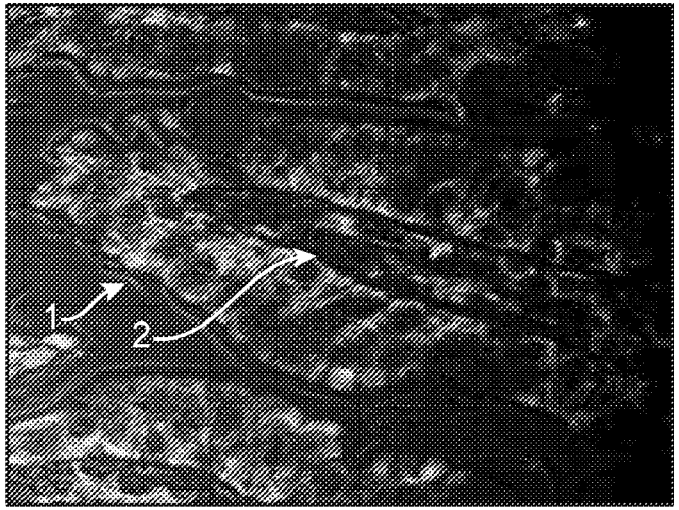
ФИГ.20A



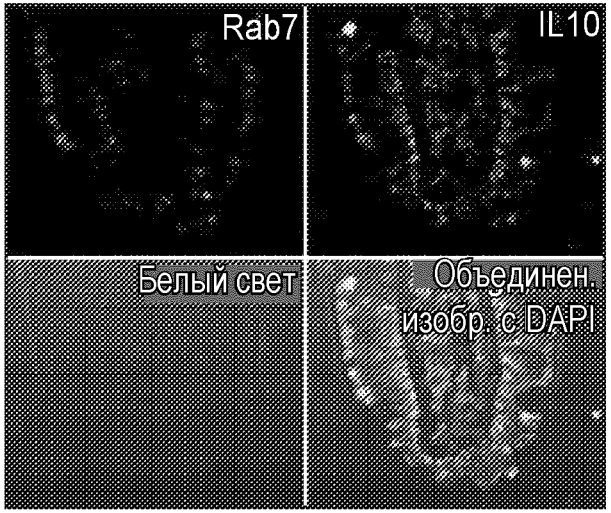
ФИГ.20B

ФИГ.20C

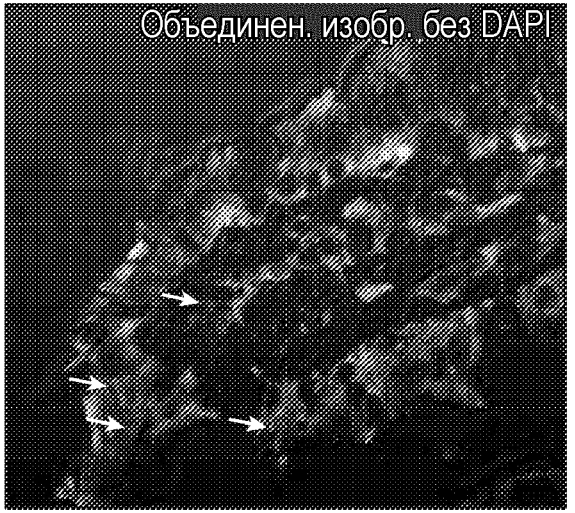
ФИГ.20



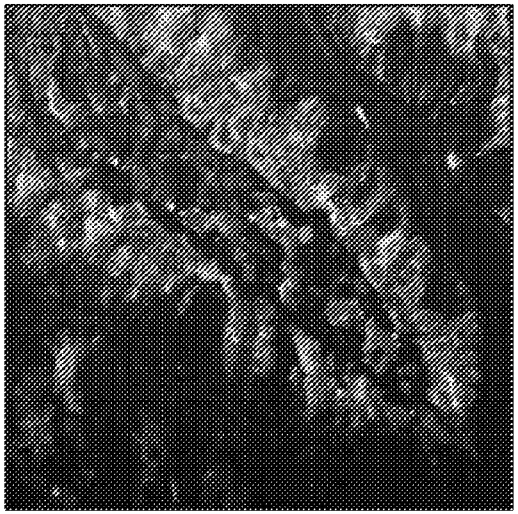
ФИГ.21A



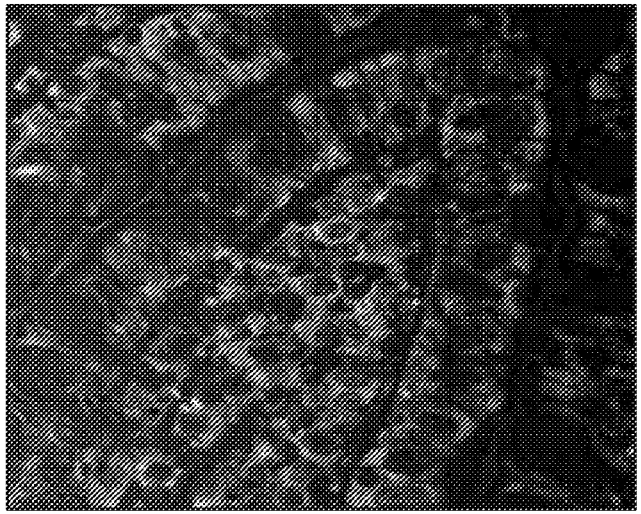
ФИГ.21B



ФИГ.21C

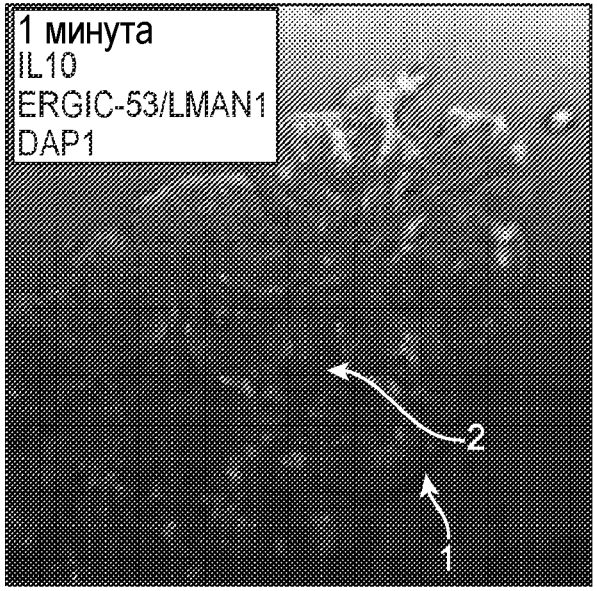


ФИГ.21D

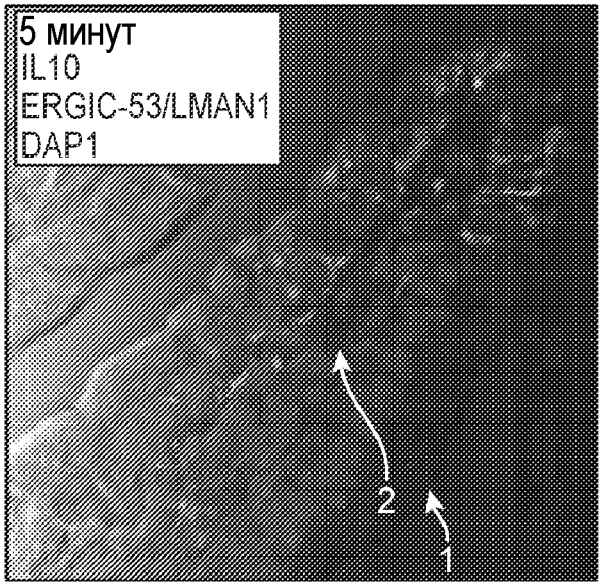


ФИГ.21E

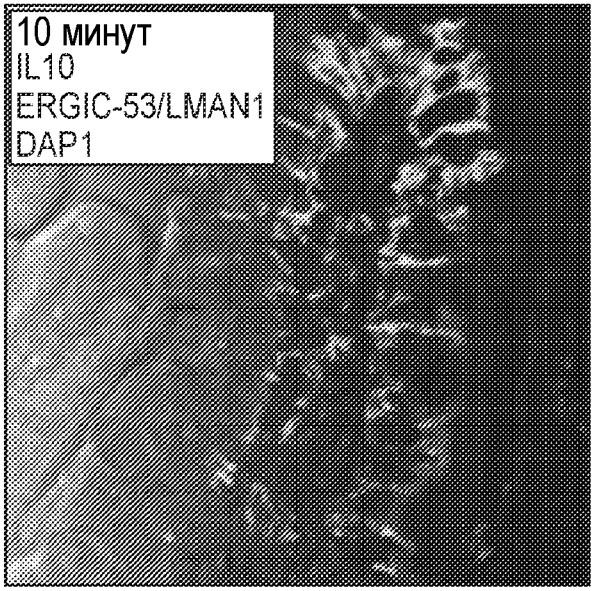
ФИГ.21



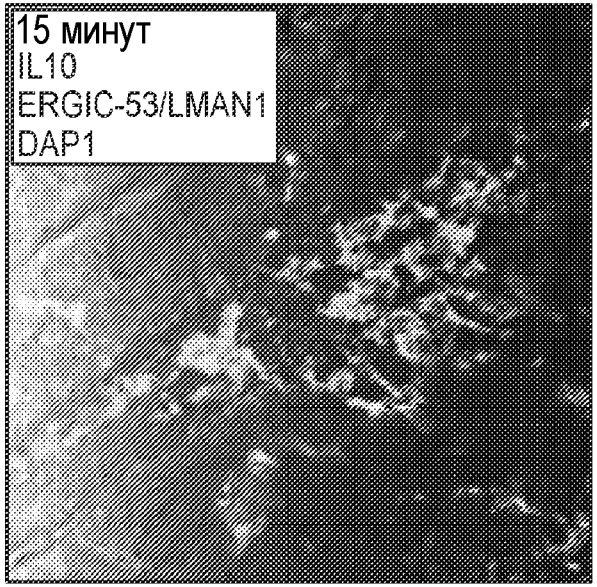
ФИГ.21F



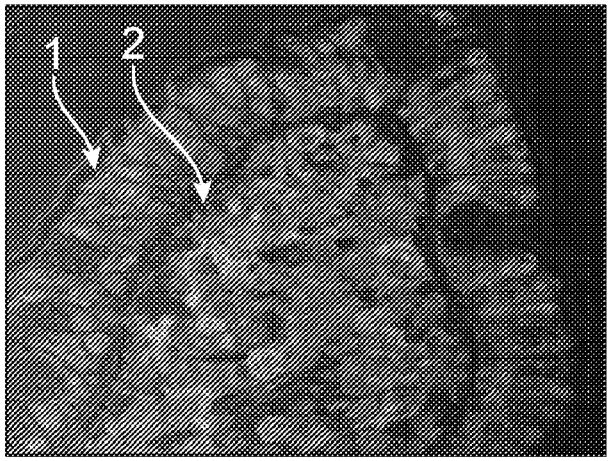
ФИГ.21G



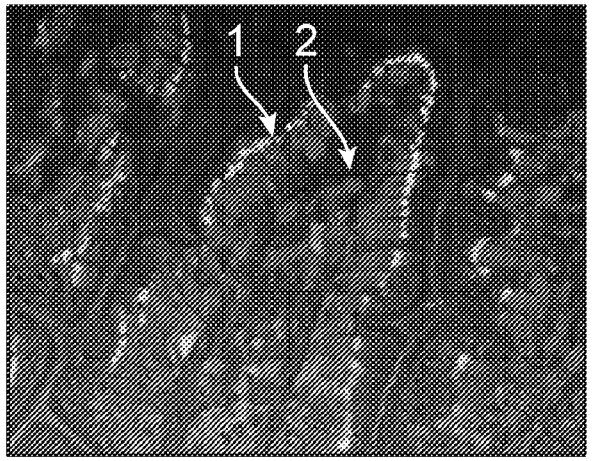
ФИГ.21H



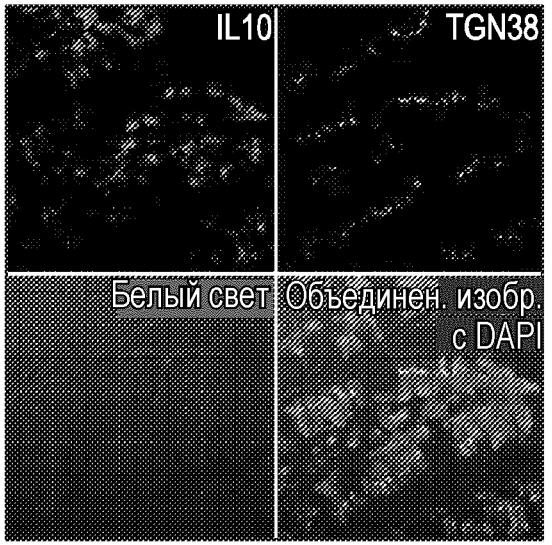
ФИГ.21I



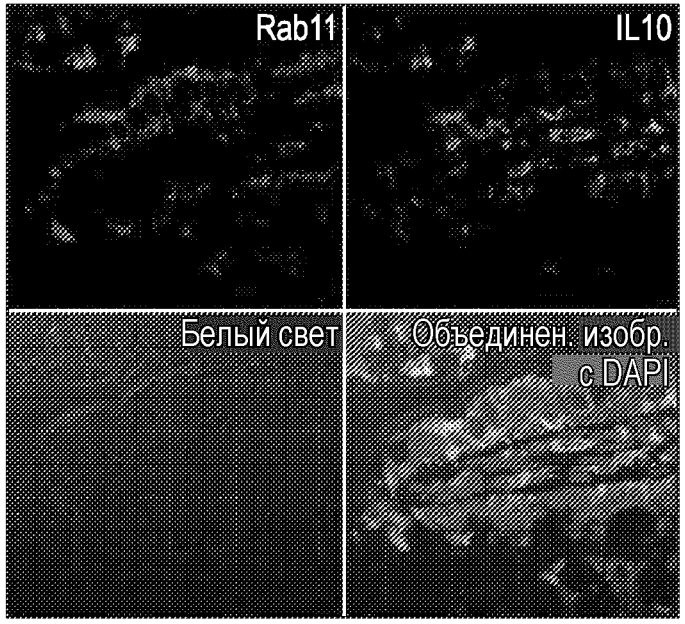
ФИГ.21J



ФИГ.21K

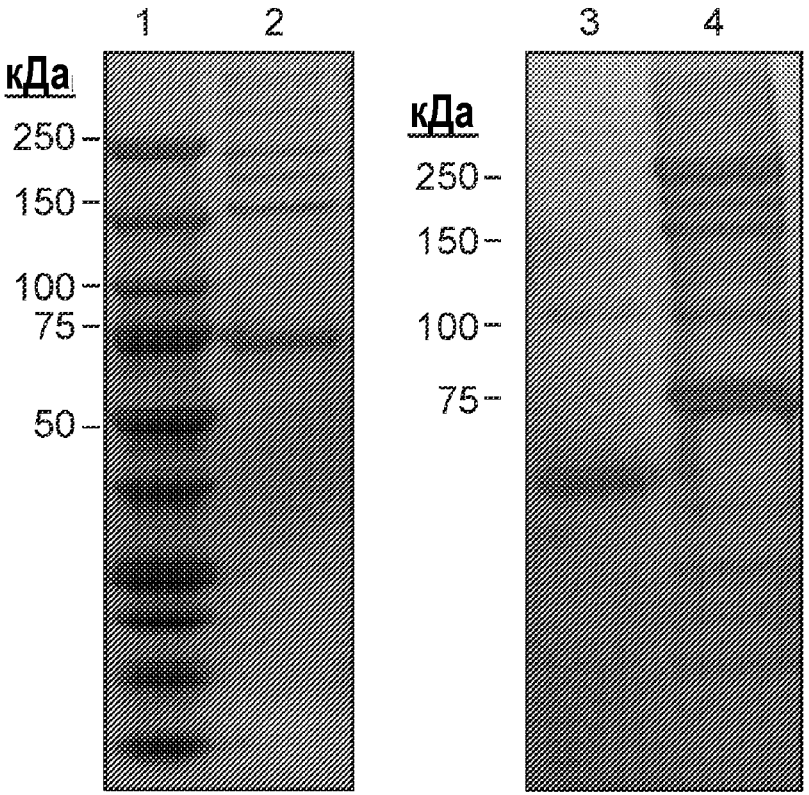


ФИГ.21L



ФИГ.21M

ФИГ.22

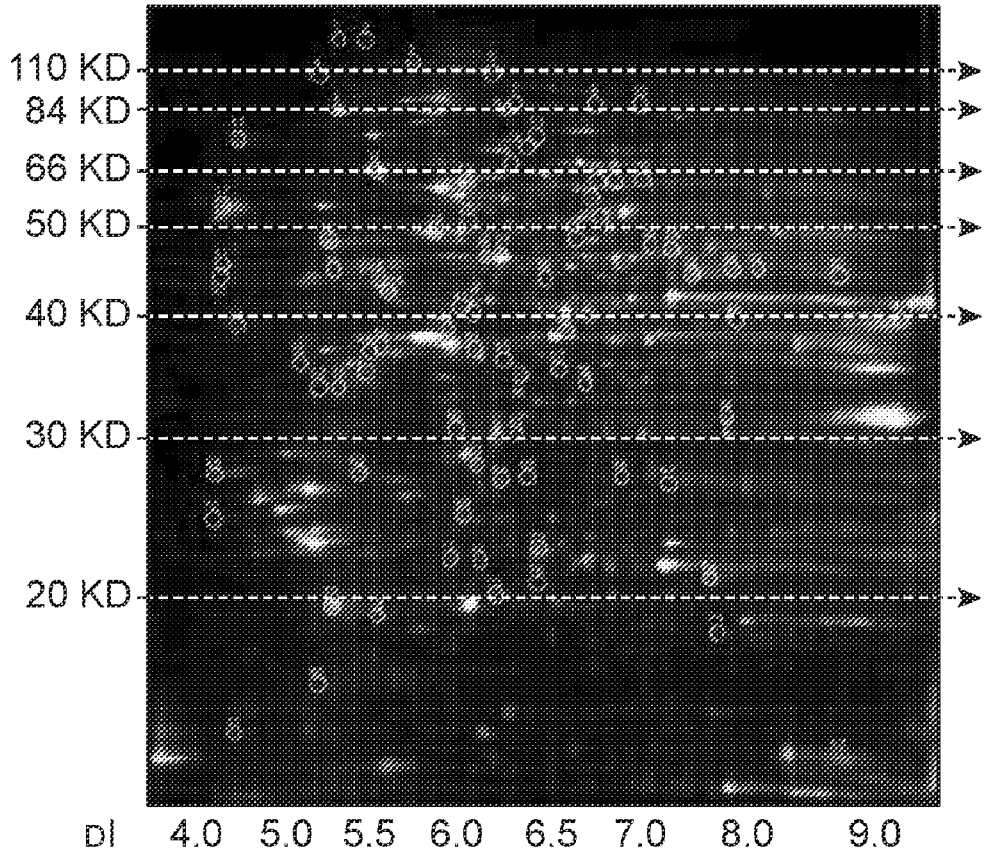


1 - стандарты молекулярной массы
2 - захват IP с белком-носителем
3 - магнитный шарик-биотин белок-носитель
4 - магнитный шарик-polyHis белок-носитель

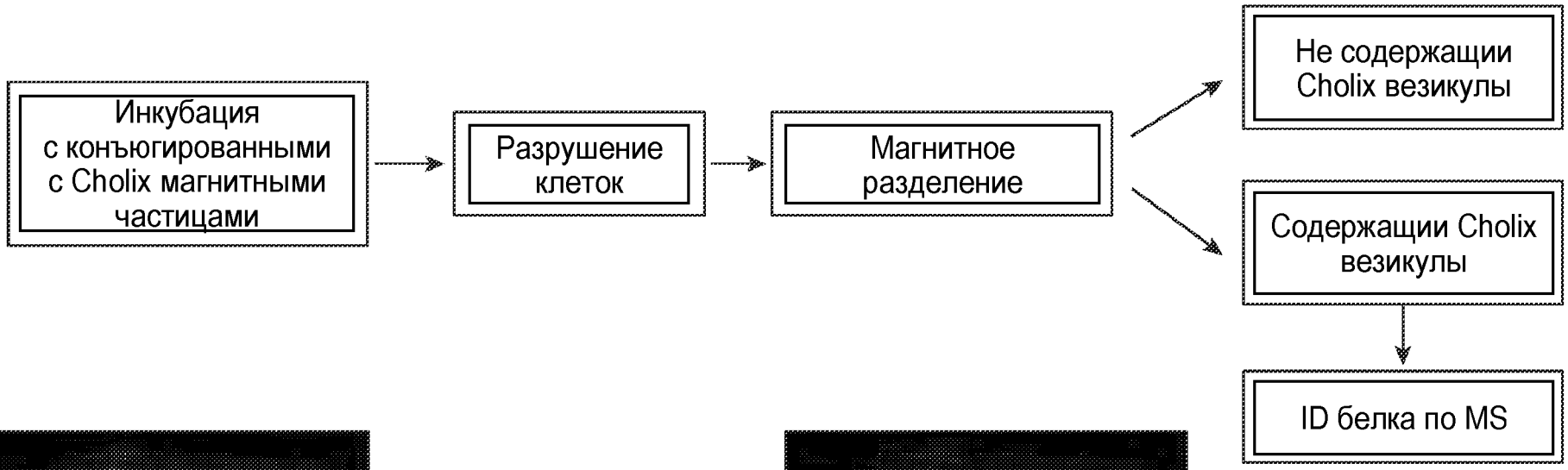
Данные показали, что был определен протокол промывания, достаточного для ограничения степени неспецифического захвата белка, и обоснован переход к 2-D SDS-PAGE и масс-спектрометрическому анализу

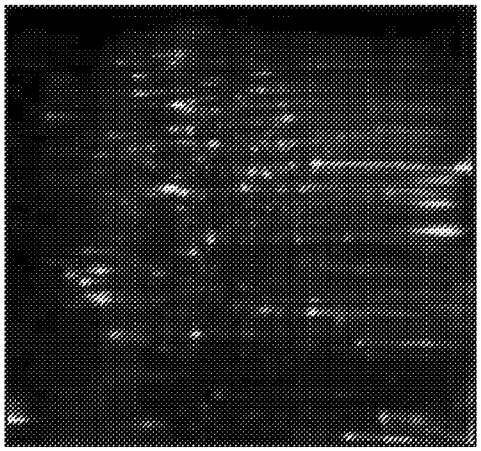
ФИГ.23

Нумерованные кружки относятся к конкретным белкам, которые были намечены для идентификации с помощью масс-спектрометрического анализа. Они отображают те, которые возрастали в пуле анализируемой смеси шариков-носителй, и ряд контрольных белков, используемых для проверки методологии

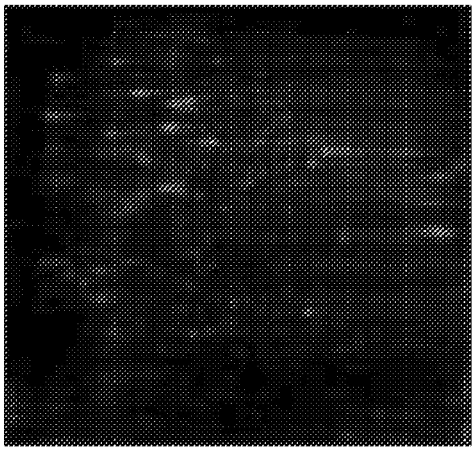


ФИГ.24





Фракция немагнитных везикул, демонстрирующая все белки в этих поляризованных клетках Caco-2, которые могут быть захвачены в этом процессе

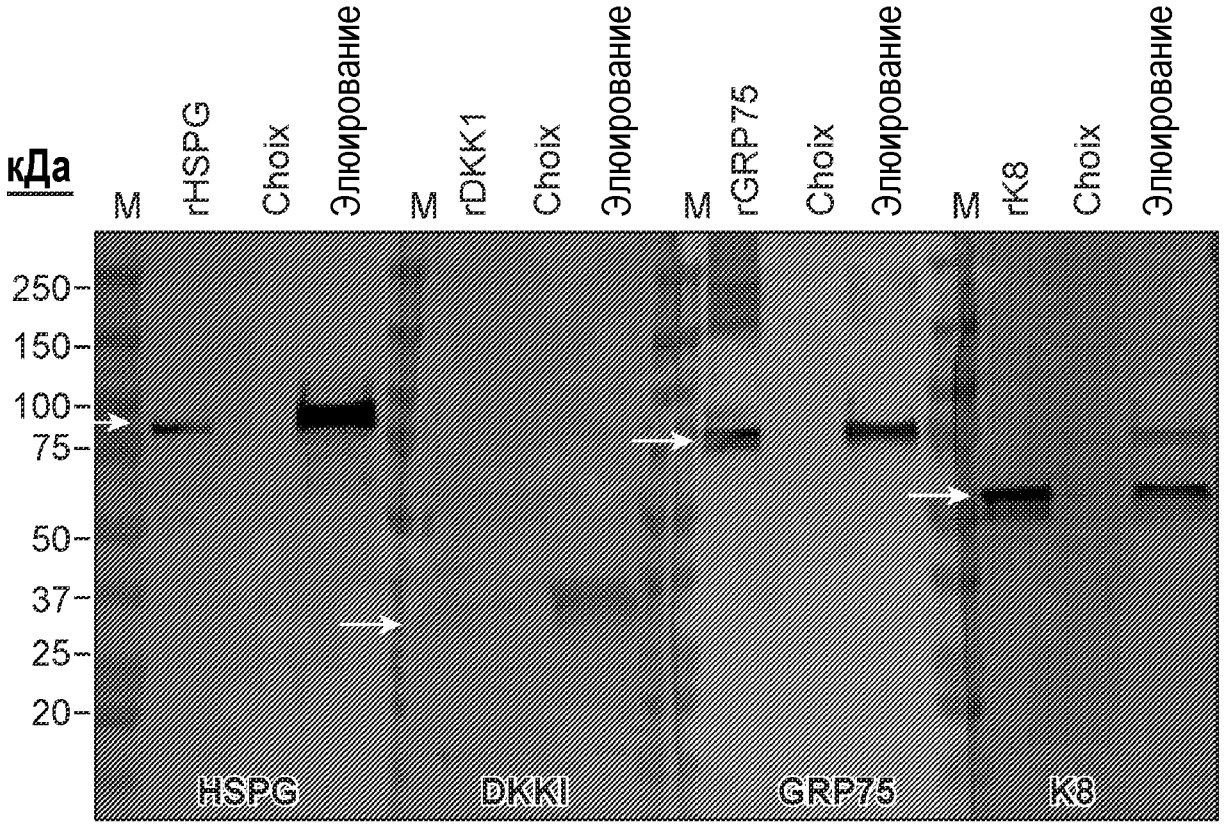


Фракция везикул, захваченных с использованием материала зонда-носителя магнитных шариков

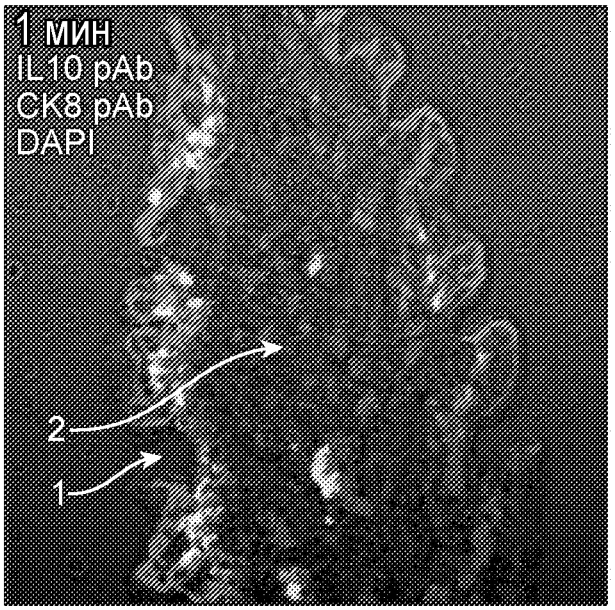
ФИГ.25

Белок-кандидат	Везикулы Caco	Caco-2 PD Cholix-His	Caco-2 PD Cholix-Биотин	Caco-2 IP anti-F4/80	Тощая кишка крысы PD Cholix-His	Тощая кишка крысы PD Cholix-Биотин	Ms-достовер-ность
Цитокератин	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Высокая
Гепарансульфат-протеогликан		✓					Высокая
Белок теплового шока	✓	✓			✓	✓	Высокая
АТР-синтаза	✓	✓			✓	✓	Высокая
Ламинин	✓	✓		✓	✓	✓	Низкая
Тубулин	✓	✓		✓	✓	✓	Низкая
Актин	✓	✓	✓		✓	✓	Низкая
14-3-3	✓				✓	✓	Высокая
Глиальный фибриллярный кислый белок	✓				✓		
Dickkopf		✓					??

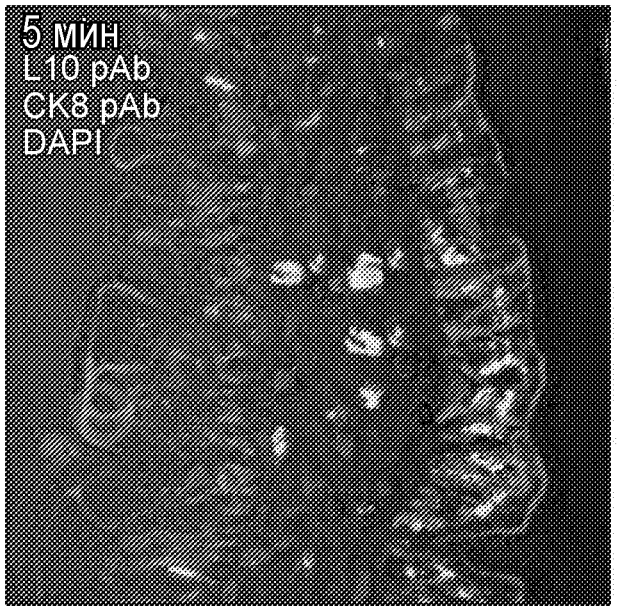
ФИГ.26


кДа
M
rHSPG
Choix
Элюирование
M
rDKK1
Choix
Элюирование
M
rGRP75
Choix
Элюирование
M
rK8
Choix
Элюирование
250
150
100
75
50
37
25
20
HSPG
DKKI
GRP75
K8

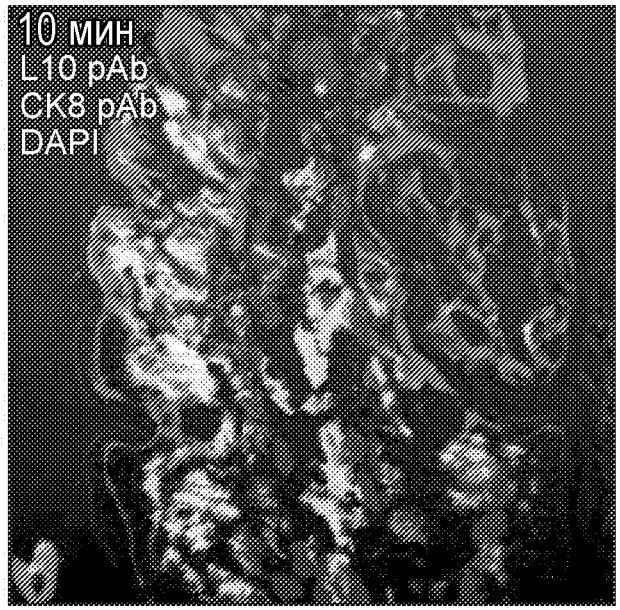
Связывание шариков с Cholix
Инкубация шариков с покрытием с чистым белком
Элюирование
Обнаружение захваченных белков
Вестерн блоттинг или ELISA



ФИГ.27A



ФИГ.27B

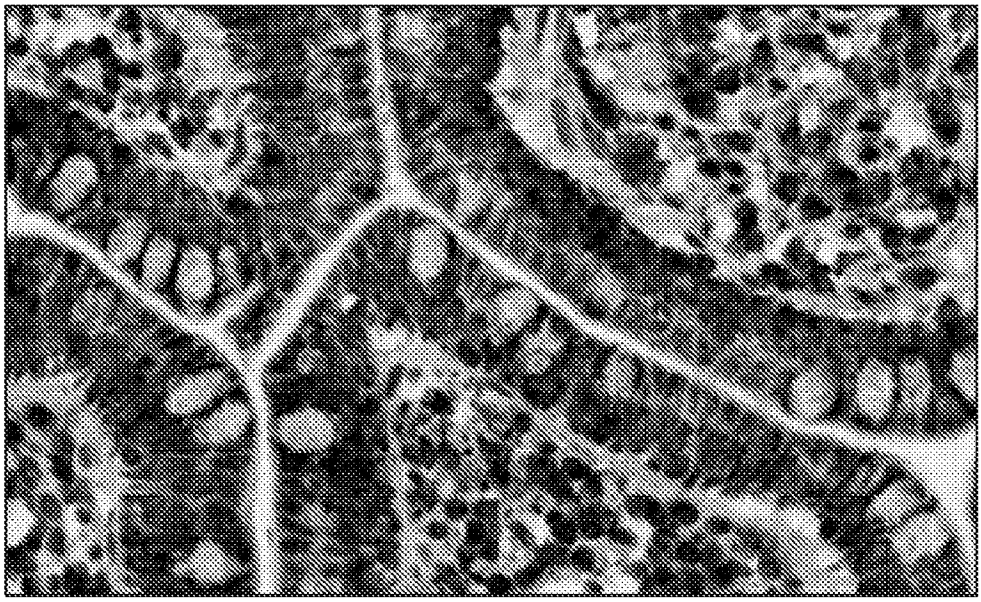


ФИГ.27C

ФИГ.27

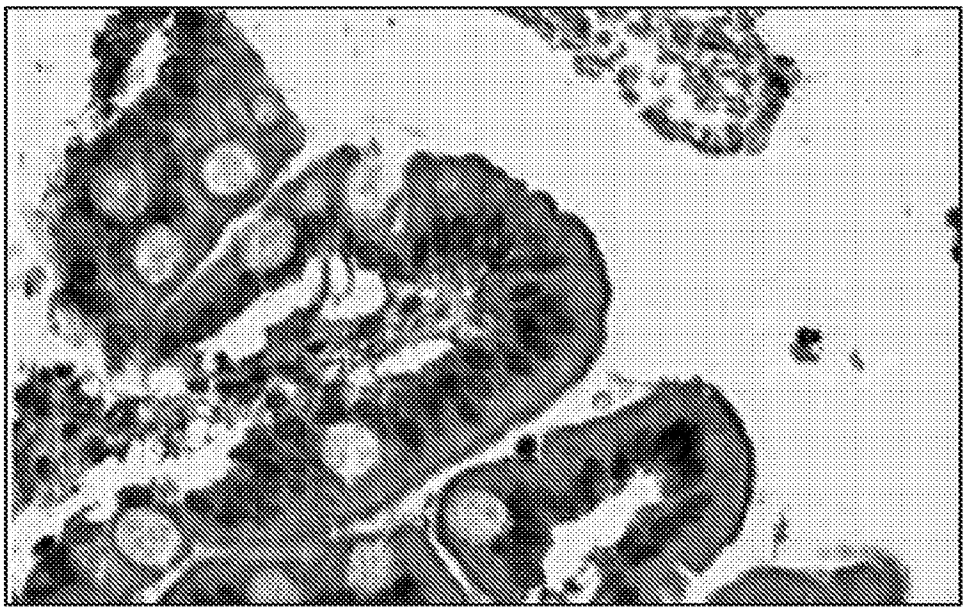
ФИГ.28A

GRP 75



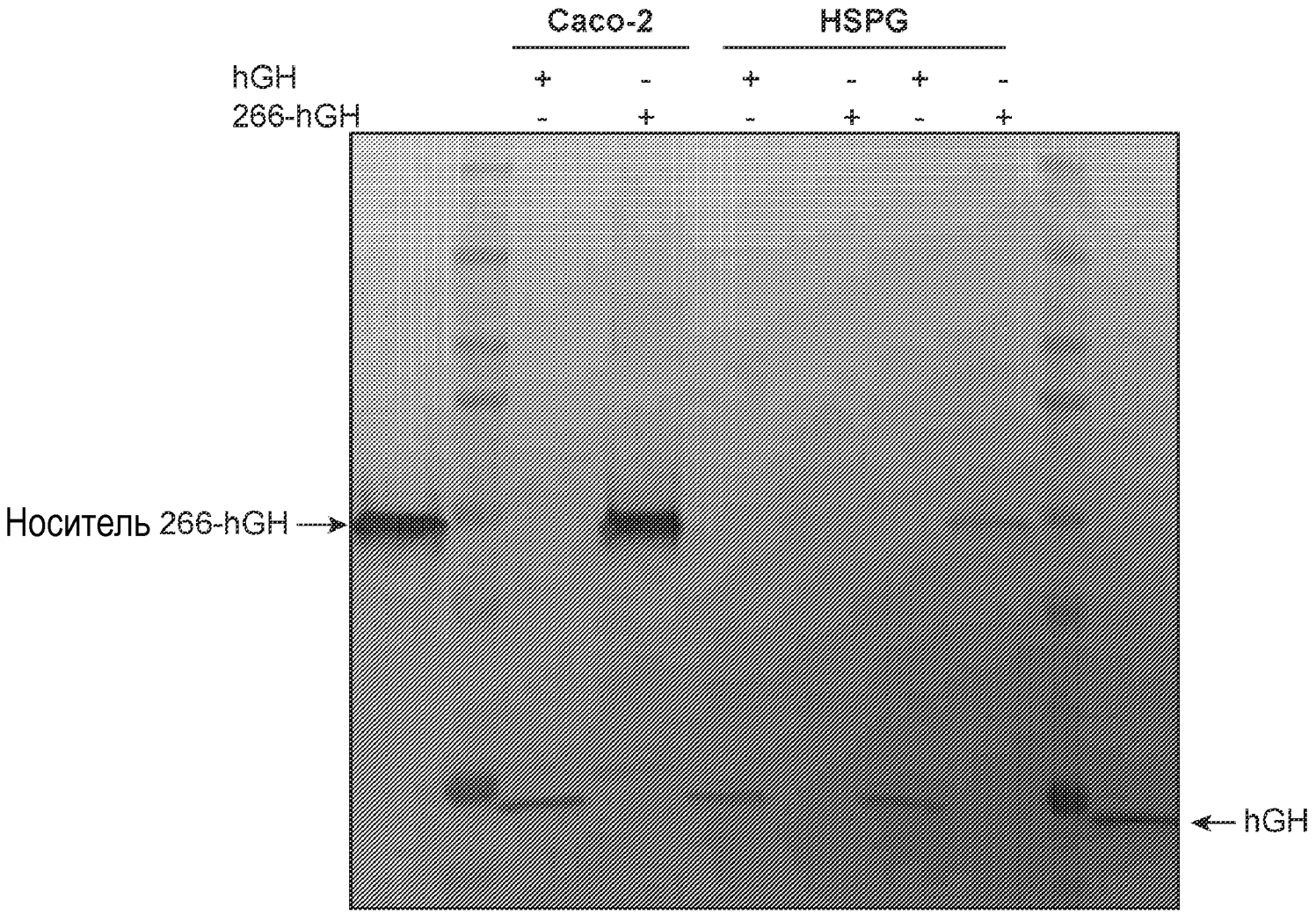
ФИГ.28B

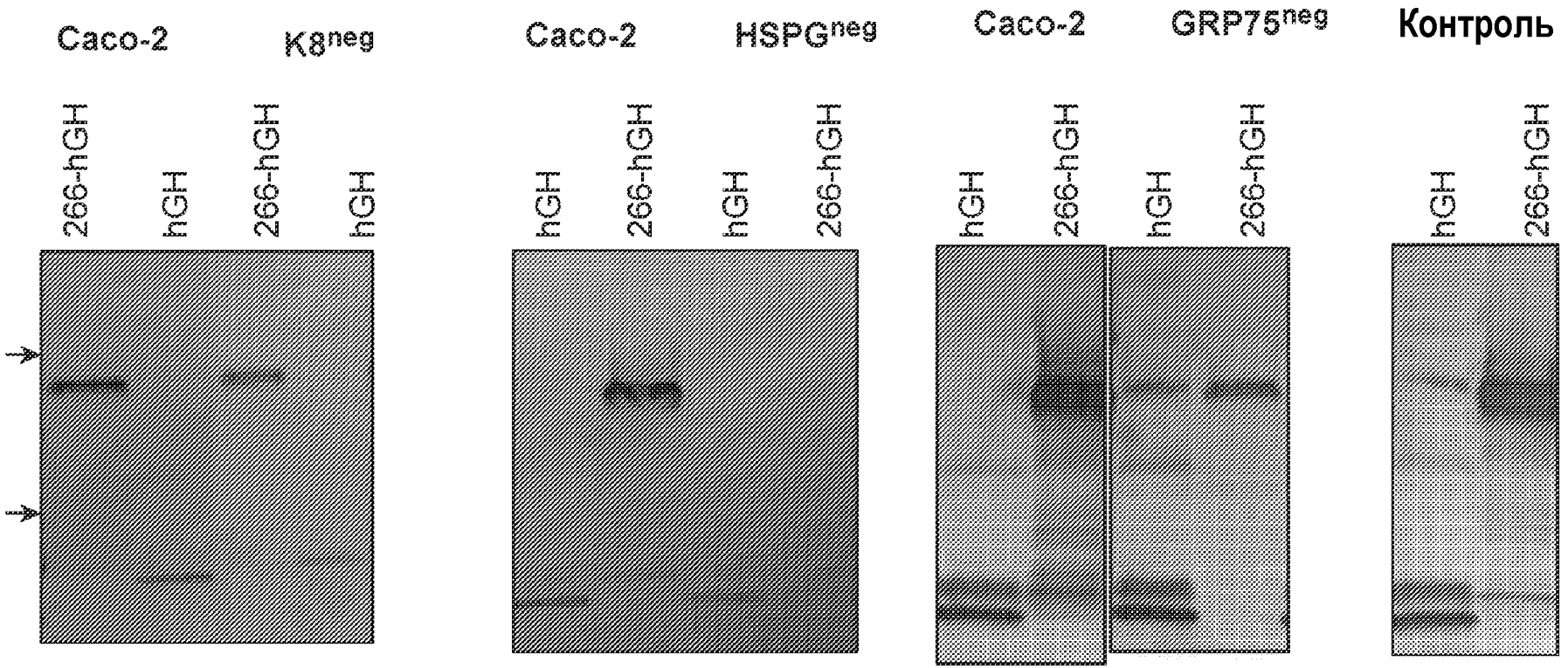
HSPG



ФИГ.28

ФИГ.29



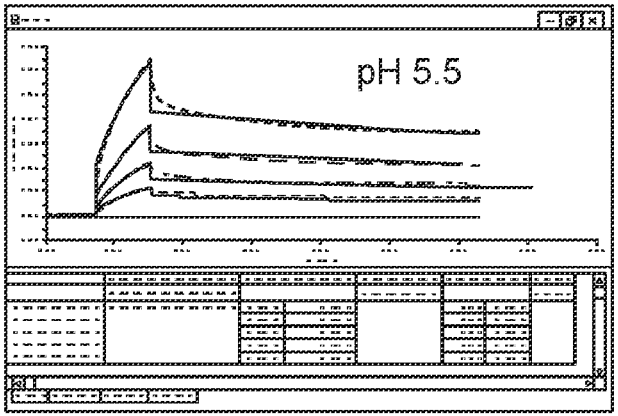


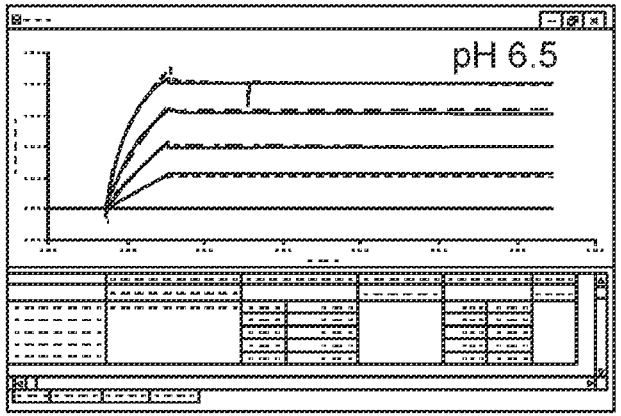
ФИГ.30A ФИГ.30B ФИГ.30C ФИГ.30D

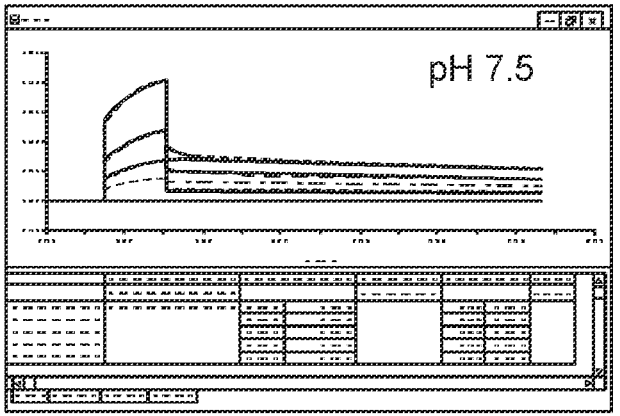
ФИГ.30

ФИГ.31

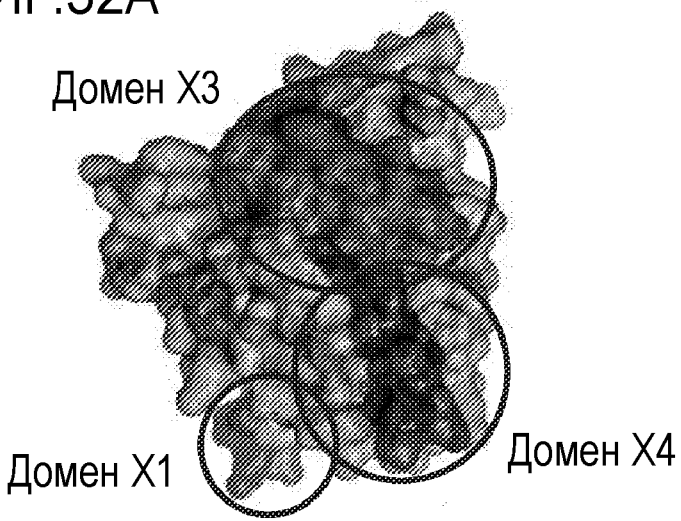
Тестируемый белок	Белок с покрытием	Тестируемый буфер	ka (1/мс)	ka (1/с)	KD (M)	Аффинность
Grp75	Chx-Биотин	1xTBS,pH5.5	1.64E+04	2.68E-04	1.63E-08	16.3 нМ
Grp75	Chx-Биотин	1xTBS,pH6.5	3.77E+04	2.33E-05	6.17E-10	0.617 нМ
Grp75	Chx-Биотин	1xTBS,pH7.5	2.87E+04	3.53E-04	1.23E-08	12.3 нМ



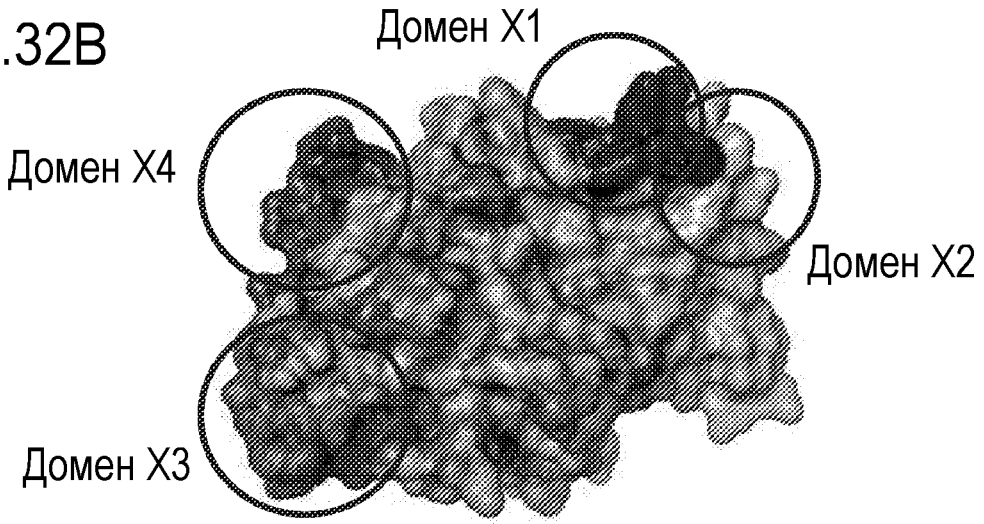




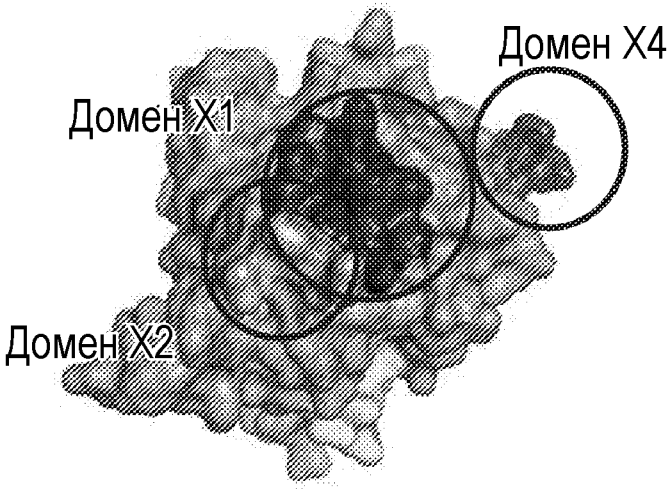
ФИГ.32A



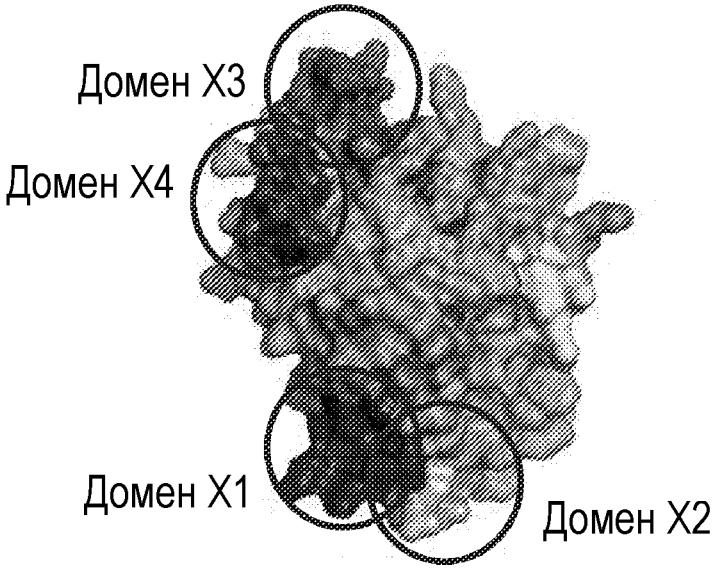
ФИГ.32B



ФИГ.32C



ФИГ.32D



ФИГ.32